

**Universidad Autónoma de Madrid**  
**Facultad de Ciencias**  
**Departamento de Biología Molecular**

**REQUERIMIENTOS DE SECUENCIA PARA LA  
REPLICACIÓN Y LA ENCAPSIDACIÓN DE  
MINIGENOMAS DERIVADOS DEL  
CORONAVIRUS DE LA GASTROENTERITIS  
PORCINA TRANSMISIBLE**

**M<sup>a</sup> Carmen Capiscol Pérez de Tudela**  
**Madrid, 2007**



**Universidad Autónoma de Madrid  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Biología Molecular**

**REQUERIMIENTOS DE SECUENCIA PARA LA  
REPLICACIÓN Y LA ENCAPSIDACIÓN DE  
MINIGENOMAS DERIVADOS DEL CORONAVIRUS DE LA  
GASTROENTERITIS PORCINA TRANSMISIBLE**

Memoria presentada por M<sup>a</sup> Carmen Capiscol Pérez de  
Tudela para optar al grado de Doctora en Biología  
Molecular por la Universidad Autónoma de Madrid.

Madrid, Octubre de 2007.





El trabajo que se describe en esta memoria ha sido realizado en el Centro Nacional de Biotecnología (CNB, CSIC) bajo la codirección de los doctores Luis Enjuanes Sánchez e Isabel Sola Gurpegui.

Madrid, Octubre de 2007.

Fdo: Luis Enjuanes

Fdo: Isabel Sola



## **AGRADECIMIENTOS**

*En esta, la parte menos académica de la tesis, me gustaría mencionar a las personas que han tenido que soportarme día a día en estos años.*

*A Luis Enjuanes, que me apoyó, me ayudó y confió siempre en mí.*

*Agradecer a Isabel su paciencia infinita y su lucidez (mi más profunda admiración). A Juan su sorprendente buen rollo y su don para llegar sonriendo el lunes por la mañana (¿cómo se hace?).*

*Del laboratorio 114 me quedo con la capacidad de Sonia para no crispase, con la mirada de cordero degollado (“a lo Setsuko”) de José Luis y los infinitos favores que me hizo a lo largo de esta tesis, con la pachanga de Jasmina, con el tesón y la complicidad de Carmen, con la inteligente ironía de Aitor, con la aparente candidez de Marta, con la única persona del laboratorio con un gusto musical decente (Carlos), con la experiencia de Fernando, con el saber estar de Marga y con la alucinante energía y buen humor de Kike.*

*A los que fueron el 114, muchas gracias, especialmente a ti, Cristina, por esos raticos tan buenos. Gracias a la doctora cum laude en simpatía Diana “Golden” y a Verónica y a Javi, por sus atenciones.*

*A mis compañer@s de Tupperware y otras cosas, que han ido menguando con los años; en los últimos tiempos Sole y Ana, tanto monta, monta tanto. Al clan pseudo-torrecampeño en Madrid (Sergio<sup>2</sup>, Salva, Chari, María y David...) y al clan torrecampeño repartido por el mundo (Susana, Óscar, Paula, Toni, Mariví, Encarni, Paco, Juana M<sup>a</sup>... y a todos los demás). Gracias a esas monitoras de ensayos clínicos, Luisa y Espe. A Imma, a Marta, a Gema, a Paulina, a Cecilia y Andreas... y a tanta gente que me alegra la existencia.*

*No puedo dejar de recordar el que ha sido uno de mis mayores descubrimientos de esta tesis, ¡la música compartida del iTunes! con la que he pasado tantas horas conectada.*

*Los últimos siempre son los primeros. A mis padres, GRACIAS POR TODO. A mi hermana con carácter vitoriano. A Andy García, mi Pepito Grillo particular, un trocito de mí por ahí por el mundo.*



*A mis padres*



<b>ABREVIATURAS</b>	<b>17</b>
<b>RESUMEN EN INGLÉS</b>	<b>19</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>21</b>
<b>1.1. INTRODUCCIÓN A LOS CORONAVIRUS. EL VIRUS DE LA GASTROENTERITIS PORCINA TRANSMISIBLE</b>	<b>23</b>
1.1.1. Taxonomía	23
1.1.2. Estructura y composición de los viriones	25
1.1.2.1. Genoma	27
1.1.2.2. Proteína S	27
1.1.2.3. Proteína M	27
1.1.2.4. Proteína E	28
1.1.2.5. Proteína N	28
1.1.2.6. Proteínas no estructurales	28
1.1.2.7. Proteínas accesorias	29
1.1.3. Ciclo viral	29
<b>1.2. GENOMAS DEFECTIVOS</b>	<b>30</b>
1.2.1. Genomas defectivos derivados de coronavirus	31
1.2.2. Genomas defectivos derivados del TGEV	31
<b>1.3. SÍNTESIS DE RNA</b>	<b>33</b>
1.3.1. Requerimientos de secuencia	34
1.3.1.1. Estructuras de RNA implicadas en la replicación del genoma de coronavirus	35
1.3.2. Proteínas necesarias para la replicación de coronavirus	36

1.3.3. Síntesis discontinua de RNA: transcripción de RNAs subgenómicos	37
1.3.3.1. Regulación de la transcripción	39
1.3.4. Recombinación	40
<b>1.4. ENCAPSIDACIÓN DE GENOMAS VIRALES</b>	<b>41</b>
1.4.1. El proceso de encapsidación	42
1.4.2. Un modelo de estudio: la señal de encapsidación de retrovirus	43
1.4.3. Señales de encapsidación en coronavirus	45
<b>OBJETIVOS</b>	<b>47</b>
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>51</b>
<b>2.1. CÉLULAS</b>	<b>53</b>
2.1.1. Líneas celulares	53
2.1.2. Crecimiento de células eucariotas	53
2.1.3. Transfección transitoria de células eucariotas	53
2.1.4. Transfección estable de células que expresan el replicón del alfavirus Sindbis	54
<b>2.2. VIRUS</b>	<b>54</b>
2.2.1. Aislados virales	54
2.2.2. Crecimiento y titulación del TGEV	55
2.2.3. Rescate de minigenomas en <i>trans</i> con un virus complementador	55
2.2.4. Rescate y amplicación de cDNAs virales recombinantes expresados bajo el promotor de citomegalovirus. Obtención de clones virales	55
2.2.5. Purificación de virus TGEV	56
2.2.5.1. Purificación parcial en colchón de sacarosa al 15%	56
2.2.5.2. Purificación parcial en gradiente discontinuo de sacarosa al 15 y 43%	57



2.2.5.3. Purificación en gradiente continuo de sacarosa	57
2.2.5.4. Inmunopurificación de viriones	57
<b>2.3. BACTERIAS</b>	<b>58</b>
2.3.1. Cepas bacterianas	58
2.3.2. Crecimiento de bacterias	58
2.3.3. Preparación de bacterias competentes para electroporación	59
2.3.4. Transformación de bacterias por electroporación	59
<b>2.4. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE DNA</b>	<b>59</b>
2.4.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	59
2.4.2. Electroforesis de DNA de geles de agarosa	60
2.4.3. Purificación de DNA de reacciones enzimáticas	60
2.4.4. Purificación de DNA en geles de agarosa	60
2.4.5. Enzimas de clonaje: restricción, generación de extremos romos, desfosforilación y ligación de DNA	60
2.4.6. Plásmidos de clonaje de productos de PCR	61
2.4.7. Plásmidos para la expresión en células eucariotas	61
2.4.8. Otros plásmidos	62
2.4.9. Purificación de plásmidos	62
<b>2.5. CLONAJE DEL cDNA DE MINIGENOMAS SINTÉTICOS DERIVADOS DEL VIRUS TGEV EN PLÁSMIDOS DE EXPRESIÓN DE CÉLULAS EUCARIOTAS</b>	<b>63</b>
2.5.1. Generación del cDNA del minigenoma M26	63
2.5.2. Generación de los plásmidos que contienen el cDNA de los minigenomas M24, M22, M19, M17 y M15	63
2.5.2.1. Introducción de las regiones FA y FB en los minigenomas M22, M19 y M17	66
2.5.2.2. Introducción de las regiones FC y FD en el minigenoma MA1	66
2.5.2.3. Introducción del gen de la $\beta$ -glucuronidasa en los minigenomas M15 y MA1	67

2.5.3. Generación de los plásmidos que contienen el cDNA de minigenomas en los que se han eliminado estructuras secundarias previstas por el programa mFOLD	67
2.5.4. Generación de los plásmidos que transcriben desde el minigenoma M39 las secuencias que potencialmente contienen la señal de encapsidación	68
<b>2.6. OBTENCIÓN DE cDNAs DE VIRUS TGEV Y DEL REPLICÓN DEL ALFAVIRUS SINDBIS, QUE EXPRESAN RNAs POTENCIALMENTE RESPONSABLES DE LA ENCAPSIDACIÓN</b>	<b>70</b>
2.6.1. Generación de cDNAs de virus recombinantes en plásmidos pBACs, que incluyen en la posición de los genes 3a/b secuencias solapantes del extremo 5' del TGEV	70
2.6.2. Generación de replicones del alfavirus Sindbis que expresan RNAs del extremo 5' del TGEV	74
<b>2.7. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE RNA</b>	<b>74</b>
2.7.1. Extracción del RNA celular	74
2.7.2. Extracción del RNA viral	75
2.7.3. Transferencia e hibridación a membranas de RNA ( <i>Northern blot</i> ). Síntesis de sondas	75
2.7.4. RT-PCR cualitativa	75
2.7.5. RT-PCR cuantitativa o en tiempo real	77
2.7.5.1. Cálculo de la eficiencia de encapsidación de RNAs	78
2.7.6. Tratamiento con DNAsa del RNA	78
2.7.7. Tratamiento con RNAsa A de viriones	79
2.7.8. Ensayo de replicación de minigenomas en pase P0	79
2.7.9. Predicciones de estructura secundaria del RNA con el programa mFOLD (versión 3.2)	80
<b>2.8. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE VIRIONES POR TINCIÓN NEGATIVA</b>	<b>80</b>

<b>3. RESULTADOS</b>	<b>81</b>
<b>3.1. ESTUDIO DE LAS SECUENCIAS MÍNIMAS NECESARIAS PARA EL RESCATE DE MINIGENOMAS DERIVADOS DEL TGEV</b>	<b>83</b>
3.1.1. Requerimiento de los extremos 5' y 3' para el rescate en <i>trans</i> de minigenomas. Generación del minigenoma sintético M26	83
3.1.2. Rescate del genoma defectivo M26	85
3.1.3. Cuantificación relativa del rescate de minigenomas en <i>trans</i>	88
3.1.4. Delimitación de la secuencia del extremo 5' requerida para el rescate en <i>trans</i> de minigenomas sintéticos	90
3.1.5. Secuencias candidatas para aumentar la eficiencia del rescate en <i>trans</i> : regiones FA y FB	93
3.1.6. Requerimiento de las regiones FC y FD en el rescate de minigenomas	95
3.1.7. Tamaño mínimo requerido para el rescate en <i>trans</i> de minigenomas: inserción del gen de la $\beta$ -glucuronidasa en los genomas defectivos	96
3.1.8. Influencia de la multiplicidad de infección en el rescate de las genomas defectivas	97
<b>3.2. LOCALIZACIÓN DE DOMINIOS CONCRETOS, EN EL EXTREMO 5' DEL MINIGENOMA M26, IMPLICADOS EN EL RESCATE DE GENOMAS DEFECTIVOS</b>	<b>98</b>
3.2.1. Generación de minigenomas con estructuras en horquilla delecionadas	98
3.2.2. Rescate de minigenomas en los que se han delecionado dominios de estructura secundaria definidos	100
<b>3.3. DIFERENCIACIÓN ENTRE REPLICACIÓN Y ENCAPSIDACIÓN DE GENOMAS DEFECTIVOS</b>	<b>103</b>
3.3.1. Optimización de un ensayo de replicación de minigenomas en fase P0	103
3.3.2. Estudio de los niveles de replicación de los genomas defectivos: influencia de la deleción progresiva del extremo 5' y de estructuras en horquilla	105

<b>3.4. LOCALIZACIÓN DE LA SEÑAL DE ENCAPSIDACIÓN EN EL VIRUS TGEV</b>	<b>107</b>
<b>3.4.1.</b> Secuencias de RNA que facilitan la encapsidación en el TGEV	<b>107</b>
<b>3.4.2.</b> Estudio cuantitativo de RNAs encapsidados en viriones purificados	<b>109</b>
<b>3.4.3.</b> Optimización de un ensayo de encapsidación de RNAs para el análisis por RT-PCR cuantitativa	<b>113</b>
<b>3.4.4.</b> Generación de virus recombinantes expresando RNAs subgenómicos derivados del extremo 5' del minigenoma M26	<b>114</b>
<b>3.4.5.</b> Estudio de la encapsidación de RNAs subgenómicos conteniendo secuencias portencialmente responsables del empaquetamiento del RNA	<b>119</b>
<b>3.5. ANÁLISIS DEL POSIBLE ACOPLAMIENTO ENTRE LOS PROCESOS DE REPLICACIÓN Y ENCAPSIDACIÓN</b>	<b>124</b>
<b>3.5.1.</b> Generación de replicones del virus Sindbis expresando las regiones potencialmente responsables de la encapsidación en el TGEV	<b>124</b>
<b>3.5.2.</b> Encapsidación de RNAs transcritos por el replicón del virus Sindbis	<b>126</b>
<b>4. DISCUSIÓN</b>	<b>131</b>
<b>4.1. SECUENCIAS MÍNIMAS REQUERIDAS PARA EL RESCATE DE MINIGENOMAS DERIVADOS DEL TGEV</b>	<b>133</b>
<b>4.1.1.</b> Análisis del requerimiento de secuencias internas del genoma viral para el rescate de genomas defectivos	<b>133</b>
<b>4.1.2.</b> Requerimiento de la traducción de la ORF contenida en el RNA de los minigenomas derivados del TGEV para su rescate	<b>135</b>
<b>4.1.3.</b> Región 5' mínima requerida para el rescate de minigenomas. Influencia del tamaño del minigenoma y de la mdi	<b>136</b>

<b>4.2. REQUERIMIENTOS DE SECUENCIA PARA LA ENCAPSIDACIÓN DEL TGEV</b>	<b>138</b>
<b>4.2.1.</b> Análisis de la encapsidación de RNAs subgenómicos en viriones	<b>139</b>
<b>4.2.2.</b> Señales para la encapsidación específica de RNAs en <i>cis</i>	<b>140</b>
<b>4.2.3.</b> Estructura secundaria asociada a la señal de encapsidación	<b>144</b>
 <b>4.3. SECUENCIAS MÍNIMAS REQUERIDAS PARA LA REPLICACIÓN DEL TGEV</b>	 <b>146</b>
 <b>4.4. ANÁLISIS DEL ACOPLAMIENTO ENTRE LA REPLICACIÓN Y LA ENCAPSIDACIÓN DEL GENOMA DEL TGEV</b>	 <b>149</b>
  <b>CONCLUSIONES</b>	  <b>151</b>
   <b>BIBLIOGRAFÍA</b>	   <b>155</b>



<b>aa</b>	aminoácido
<b>APN</b>	aminopeptidasa N
<b>BAC</b>	cromosoma artificial bacteriano
<b>BCoV</b>	coronavirus bovino
<b>BGH</b>	hormona de crecimiento bovina
<b>BHK</b>	<i>baby hamster kidney</i> (células de riñón de cría de hamster)
<b>BSA</b>	albúmina de suero bovina
<b>BtCoV</b>	coronavirus de murciélago
<b>CAT</b>	cloranfenicol acetil transferasa
<b>CCoV</b>	coronavirus canino
<b>CoV</b>	coronavirus
<b>cDNA</b>	DNA complementario
<b>CMV</b>	citomegalovirus
<b>CS</b>	secuencia conservada
<b>DEPC</b>	dietilpirocarbonato
<b>DI</b>	defectivo interferente
<b>DMEM</b>	medio de Eagle modificado por Dulbecco
<b>DNA</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>DNAsa</b>	desoxirribonucleasa
<b>DTT</b>	ditiotreitol
<b>EDTA</b>	etilendiaminotetraacético
<b>FCoV</b>	coronavirus felino
<b>FIPV</b>	virus de la peritonitis infecciosa felina
<b>GFP</b>	proteína verde fluorescente
<b>gRNA</b>	RNA genómico
<b>GUS</b>	$\beta$ -glucuronidasa
<b>HCoV</b>	coronavirus humano
<b>hnRNP</b>	ribonucleoproteína heterogénea nuclear
<b>hpi</b>	horas post-infección
<b>hpt</b>	horas post-transfección
<b>IBV</b>	virus de la bronquitis infecciosa
<b>kb</b>	kilobase
<b>kDa</b>	kilodalton
<b>LB</b>	medio de cultivo Luria-Bertani
<b>mdi</b>	multiplicidad de infección
<b>MHV</b>	virus de la hepatitis de ratón
<b>MoMLV</b>	virus Moloney de la leucemia de ratón
<b>mRNA</b>	RNA mensajero

## ***abreviaturas***

<b>NP40</b>	nonidet fosfato 40
<b>nt</b>	nucleótido
<b>ORF</b>	fase de lectura abierta
<b>PAC</b>	puromicina N-acetiltransferasa
<b>PAPN</b>	aminopeptidasa N porcina
<b>pCMV</b>	promotor de citomegalovirus
<b>PBS</b>	solución salina tamponada con fosfato
<b>PCR</b>	reacción en cadena de la polimerasa
<b>PEDV</b>	virus de la diarrea epidémica porcina
<b>pol II</b>	RNA polimerasa II
<b>pRSV</b>	promotor del virus del sarcoma de Rous
<b>pT7</b>	promotor del bacteriófago T7
<b>PTB</b>	proteína de unión a tractos de pirimidinas
<b>PTV</b>	virus tipo Purdue
<b>RdRp</b>	RNA polimerasa RNA dependiente
<b>RNA</b>	ácido ribonucleico
<b>RNAsa</b>	ribonucleasa
<b>rpm</b>	revoluciones por minuto
<b>RT</b>	transcripción reversa
<b>RT-PCR</b>	RT acoplada a una PCR
<b>SARS-CoV</b>	coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave
<b>SDS</b>	dodecil sulfato sódico
<b>SFT</b>	suero fetal de ternera
<b>sgRNA</b>	RNA subgenómico
<b>SL</b>	<i>stem loop</i> (estructura en horquilla)
<b>ST</b>	<i>swine testicle</i> (células de testículo de cerdo)
<b>TAE</b>	solución Tris-acetato EDTA
<b>TEN</b>	solución Tris-EDTA cloruro de sodio
<b>TGEV</b>	virus de la gastroenteritis porcina transmisible
<b>TNE</b>	solución Tris-cloruro EDTA
<b>tRNA</b>	RNA de transferencia
<b>TRS</b>	secuencia reguladora de la transcripción
<b>U</b>	unidades
<b>UFP</b>	unidades formadoras de placa
<b>UTR</b>	región no traducida
<b>UV</b>	ultravioleta
<b>VIH</b>	virus de la inmunodeficiencia humana
<b>VLP</b>	<i>virus like particle</i> (virus análogos a partículas)



Transmissible gastroenteritis virus (TGEV) is a member of *Coronaviridae*, a family of positive-strand RNA viruses. The replication of the viral RNA genome of 28.5 kb and the incorporation into particles, are specific processes based on the recognition of a set of sequences containing replication and packaging signals. In some viruses, the packaging process is coupled to replication or translation. *Cis*-acting signals are recognized by viral proteins and probably by host cell factors.

To identify *cis*-acting replication and packaging signals, the rescue of defective interferent (DI) RNAs or minigenomes by a helper virus was analyzed. The smallest TGEV-derived minigenome efficiently rescued in cell culture had 2144 nt in the 5'-end and 494 nt in the 3'-end. In order to determine the minimal 5'-end sequences required for the rescue in cell cultures, a set of M26-derived deletion mutant minigenomes was engineered. The smallest minigenome rescued, M17, contained the first 5'-end 1150 nt. The RNA of this minigenome was amplified to levels about 1000-fold lower than M26 minigenome and it was also maintained during, at least, five passages in cell cultures.

Minigenome replication was measured at passage P0 as the increase of minigenome RNA transcripts produced by the RNA-polymerase provided by the helper virus over the transcription by the RNA pol II that recognizes the CMV promoter that launches the minigenome RNAs. All analyzed minigenomes with deletions in the 5'-end 2,144 nt region were less efficient in replication than minigenome M26. M17 minigenome included the minimal sequences for replication. M15 minigenome (with 940 nt from the 5'-end of the virus genome) had a basal replication that was not sufficient for its rescue by the helper virus in cultured cells. The extent of the replication was also analyzed in M26 minigenome mutants in which 17 predicted stem loops were deleted along its sequence. In general, the replication levels were lower when the deletions affected sequences mapping within the first kilobase of the defective genome, indicating that this region is highly important for TGEV replication.

To evaluate coronavirus genome RNA packaging, the sequences derived from the 5'-end of M26 minigenome potentially responsible for this activity were transcribed using three different systems: (i) the M39 minigenome, (ii) a recombinant TGEV, or (iii) the Sindbis virus replicon. In all cases, the encapsidation of RNA sequences that were transcribed, but not replicated, was studied. Interestingly, in the Sindbis virus system, the amplification of the RNAs was independent of the presence of sequences specifically required by the coronavirus replication machinery. Only those sgRNA transcripts containing, at least, the

### *resumen en inglés*

first 242 nt from the TGEV genome 5'-end were encapsidated. Therefore, the packaging signal must be located at the 5'-end of TGEV genome. RNA packaging in TGEV is not coupled to replication, as the transcribed sgRNAs using the Sindbis virus replicon were efficiently packaged. The continuity between the leader sequence and 3' adjacent sequences, present just after the leader in the viral genome, was required for TGEV encapsidation.

## *introducción*



## 1.1. INTRODUCCIÓN A LOS CORONAVIRUS. EL VIRUS DE LA GASTROENTERITIS PORCINA TRANSMISIBLE

El modelo de estudio en esta tesis es el virus de la gastroenteritis porcina transmisible (TGEV), que pertenece al género coronavirus (CoV). Los CoVs son virus con envuelta y con un genoma RNA no segmentado de polaridad positiva. Se encuentran ampliamente distribuidos en mamíferos y aves, causando afecciones entéricas o respiratorias, principalmente, y en algunos casos, enfermedades neurológicas o hepatitis. Las infecciones son transmitidas por vía respiratoria o por una ruta oral-fecal. El TGEV infecta el tracto intestinal del ganado porcino y se describió por primera vez en EEUU (Doyle y Hutchings, 1946). La importación de ganado lo extendió a Europa (Bohl, 1981), produciendo grandes pérdidas económicas, dado que cursa con una mortalidad del 80-100% en lechones de menos de dos semanas (Saif y Wesley, 1992). El interés por esta familia viral se ha intensificado en los últimos años por la emergencia de un nuevo CoV causante del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV), aparecido entre 2002-2003 (Ksiazek y col., 2003; Peiris y col., 2003), de varios CoVs humanos, como el HCoV-NL63 (van der Hoek y col., 2004), el HCoV-HKU1 (Vabret y col., 2006), así como el descubrimiento de un elevado número de CoVs de murciélago (Woo y col., 2006), más recientemente.

### 1.1.1. TAXONOMÍA

La familia *Coronaviridae* (Cavanagh y col., 1994; Enjuanes y col., 2000; Enjuanes y col., 2007), incluye los géneros coronavirus y torovirus (Cavanagh y Horzinek, 1993) y un nuevo género tentativo, los bafinivirus (Enjuanes y col., 2007). No obstante, se ha propuesto que tanto los coronavirus como los torovirus tengan una consideración taxonómica de familia o subfamilia (González y col., 2003). Coronavirus, torovirus y bafinivirus, junto con las familias *Arteriviridae*, formada por el género arterivirus (Snijder y Meulenberg, 1998) y *Roniviridae*, constituida por los okavirus (Cowley y col., 2000; Dhar y col., 2004), se incluyen en el orden Nidovirales. Los ronivirus son los únicos miembros conocidos del orden Nidovirales que infectan invertebrados.

Los miembros del género CoVs se dividen en tres grupos con divergencias suficientes como para tener el *status* taxonómico de género (González y col., 2003). Aunque inicialmente la clasificación se basó en características antigénicas, actualmente está aceptada una clasificación basada en comparación de secuencias de genomas completos

(Gorbalenya y col., 2004; Spaan y col., 2005; Enjuanes y col., 2007) (Tabla 1). Los virus del grupo 1 y 2 infectan a mamíferos, incluyendo el hombre. El TGEV se incluye dentro del

**Tabla 1. Clasificación taxonómica del género CoV.**

<b>Grupo</b>	<b>Designación</b>	<b>Nombre</b>	<b>Hospedador</b>
<b>1a</b>	TGEV	Virus de la gastroenteritis porcina transmisible	cerdo
	FIPV	Virus de la peritonitis infecciosa felina	gato
	FCoV	Coronavirus entérico felino	gato
	CCoV	Coronavirus canino	perro
<b>1b</b>	HCoV-229E	Coronavirus humano 229E	hombre
	HCoV-NL63	Coronavirus humano NL63	hombre
	PEDV	Virus de la diarrea epidémica porcina	cerdo
	BtCoV-512	Coronavirus del murciélago 512	murciélago
<b>2a</b>	MHV	Virus de la hepatitis murina	ratón
	BCoV	Coronavirus bovino	vaca
	HCoV-OC43	Coronavirus humano OC43	hombre
	HCoV-HKU1	Coronavirus humano HKU1	hombre
	PHEV	Virus de la encefalomiелitis hemaglutinante porcina	cerdo
<b>2b</b>	SARS-CoV	Coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave	hombre
	BtCoV-HKU3	Coronavirus del murciélago HKU3	murciélago
	BtCoV-HKU5	Coronavirus del murciélago HKU5	murciélago
	BtCoV-HKU9	Coronavirus del murciélago HKU9	murciélago
	BtCoV-133	Coronavirus del murciélago 133	murciélago
<b>3</b>	IBV	Virus de la bronquitis infecciosa	pollo
	TCoV	Coronavirus del pavo	pavo
	PhCoV	Coronavirus del faisán	faisán
	GCoV	Coronavirus del ganso	ganso
	PCoV	Coronavirus de la paloma	paloma
	DCoV	Coronavirus del pato	pato

grupo 1. Los CoVs del grupo 3 infectan a aves. La clasificación del SARS-CoV basada en comparación de genomas no está consolidada. Actualmente se acepta su relación con el grupo 2, atendiendo a criterios filogenéticos basados en los genes 1a, 1b de la replicasa y a la estructura secundaria de la región 3' no traducida, dado que no tiene divergencia suficiente como para formar un cuarto grupo (Snijder y col., 2003; Gorbalenya y col., 2004).

Dentro del grupo 1 de CoVs, se pueden distinguir dos subconjuntos: el subgrupo 1a (Gorbalenya y col., 2004), que incluye el TGEV, el CoV canino (CCoV), y el CoV felino (FCoV), y el subgrupo 1b que incluye los CoVs humanos (HCoV) 229E y el más recientemente descubierto NL63, el virus de la diarrea epidémica porcina (PEDV), y el CoV del murciélago (BtCoV) 512 que fue aislado en 2005. Los CoVs del grupo 2 se han dividido en dos subconjuntos (Gorbalenya y col., 2004): el subgrupo 2a, incluyendo el virus de la hepatitis murina (MHV), el CoV bovino (BCoV), y los CoVs humanos HCoV-OC43 y HCoV-HKU1, y el subgrupo 2b, incluyendo el SARS-CoV y su pariente más cercano, el CoV del murciélago BtCoV-HKU3. Un número creciente de otros CoVs de murciélago se ha identificado recientemente en los grupos 1 y 2. Actualmente se debate si algunos de estos virus, como el BtCoV-HKU5, BtCoV-133 (aislados en 2005) y BtCoV-HKU9, pueden considerarse nuevos grupos o subgrupos (Woo y col., 2006). El grupo 3 de CoV tiene en el virus de la bronquitis infecciosa del pollo (IBV) su prototipo más representativo, aunque también incluye a otros CoVs aviares.

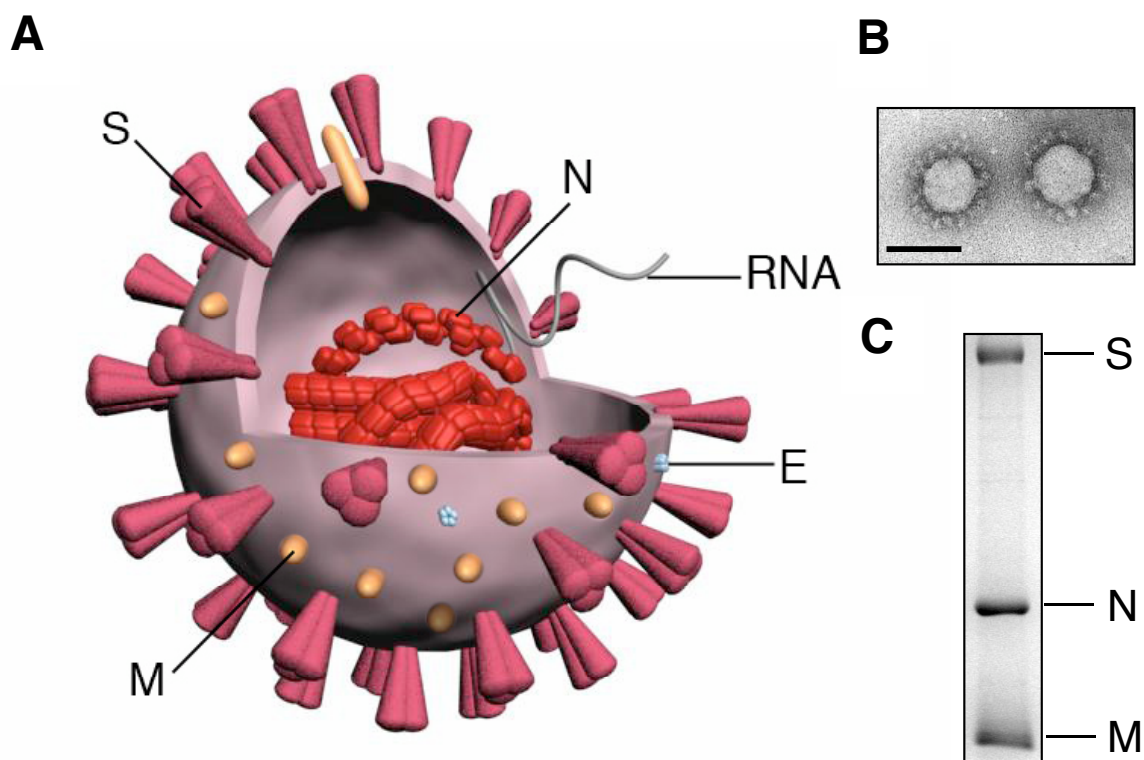
### **1.1.2. ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN DE LOS VIRIONES**

El TGEV tiene un diámetro aproximado de 100 nm. Las espículas o peplómeros de la superficie proporcionan el característico aspecto de corona que da nombre a la familia. La envuelta del TGEV está formada por tres proteínas estructurales, la proteína S o de la espícula, la proteína M o de membrana y la proteína E o de la envuelta (Fig. 1). Los viriones en CoVs son esféricos y moderadamente pleiomórficos. Existe cierta heterogeneidad en la morfología de las partículas que se atribuye, en gran medida, a distorsiones producidas por los procedimientos de tinción negativa. Preparaciones del BCoV y del TGEV por liofilización (Roseto y col., 1982) y crio-microscopía electrónica (Risco y col., 1996), respectivamente, mostraban poblaciones de viriones más homogéneas.

El interior de los viriones aparece densamente teñido mediante microscopía electrónica de tinción negativa, detectándose una nucleocápsida con simetría helicoidal. El genoma

## introducción

viral, recubierto completamente por la proteína N o de la nucleocápsida, es una molécula de RNA de polaridad positiva que presenta el mayor tamaño de entre todos los virus RNA, incluyendo los virus con genomas segmentados. Recientes estudios de resonancia magnética nuclear en el SARS-CoV han confirmado que el empaquetamiento del RNA mediante la proteína N adopta una forma helicoidal (Chen y col., 2007).



**Figura 1. Estructura física del TGEV.** (A) Se representa un esquema de la partícula viral, que incluye en la envuelta las proteínas S, M y E. La proteína S se asocia en trímeros para formar los peplómeros que constituyen la corona característica de la familia. La proteína M puede presentar dos conformaciones, una con los extremos carboxilo y amino hacia el exterior de la envuelta y otra con el extremo amino en contacto con la nucleocápsida. La proteína E forma canales de membrana de los que no se conoce la función. La nucleocápsida está formada por la proteína N, que envuelve al genoma viral, una molécula de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva. (B) Micrografía electrónica de tinción negativa de virus purificados. La barra inferior representa una longitud de 100 nm. (C) Patrón de proteínas virales obtenidas de virus purificados, analizados en un gel desnaturalizante de poliacrilamida teñido con plata. La proteína E está muy poco representada en el virión y rara vez se detecta en análisis de virus purificados. S, proteína S; M, proteína M; E, proteína E; N, proteína N.



#### 1.1.2.1. GENOMA

Los genomas de CoVs se encuentran entre las moléculas de RNA maduras más largas de la biología, oscilando entre las 27.3 kb del HCoV-229E y las 31.3 kb del MHV. El genoma del TGEV posee una longitud de 28.5 kb (Eleouet y col., 1995; Penzes y col., 2001). Los genomas de CoVs estructuralmente se asemejan a los mRNAs eucariotas, con una estructura *cap* en el extremo 5' y una cola de poli-A en el extremo 3'. Sin embargo, y a diferencia de los mRNAs, contienen múltiples fases de lectura abiertas (ORFs).

En todos los genomas de CoVs el primer gen, la replicasa viral, ocupa dos tercios de la longitud total de la molécula de RNA. El orden invariable de los genes de todos los miembros de la familia es 5'-replicasa-S-E-M-N-3'. En los extremos 5' y 3' se encuentran las regiones no traducidas (UTRs), con una longitud variable entre 210 y 530 nt. En algunos casos, existen genes accesorios entre las proteínas estructurales. En este sentido, en el TGEV se encuentran los genes no esenciales 3a/b y 7, como se ha descrito previamente.

#### 1.1.2.2. PROTEÍNA S

La proteína S es una glicoproteína de 200 kDa que constituye el componente más prominente de la envuelta del TGEV. Se asocia en trímeros para formar los peplómeros característicos del virus. Esta proteína es la responsable de la entrada del virus a la célula por unión al receptor (Delmas y col., 1992). El receptor del TGEV es la aminopeptidasa N porcina (pAPN) (Delmas y col., 1992). Además, la proteína de la espícula provoca la fusión de membranas en las células hospedadoras (Collins y col., 1982). Consta de varios dominios diferenciados: (i) la parte globular, poco conservada filogenéticamente (Enjuanes y col., 1990), (ii) una región hidrofílica (iii) una zona hidrofóbica transmembrana y (iv) una región intraviral corta, que es hidrofílica.

#### 1.1.2.3. PROTEÍNA M

El principal componente de la envuelta viral es la proteína M, una glicoproteína integral de membrana que en el TGEV tiene un tamaño de 29 kDa, incluido un péptido señal. Está implicada en el ensamblaje y la morfogénesis de CoVs, junto con la proteína E (Baudoux y col., 1998; Lim y Liu, 2001). La proteína M está formada por un ectodominio amino-terminal, seguido de tres dominios transmembrana y el endodominio carboxi-terminal, que ocupa la mayor parte de la molécula. En el TGEV se ha descrito una topología para esta proteína, no descrita en otros CoVs, donde el endodominio puede encontrarse hacia el

interior de la membrana o estar expuesto hacia el exterior del virión (Risco y col., 1996; Escors y col., 2001).

### 1.1.2.4. PROTEÍNA E

La proteína E, de 9238 Da en el TGEV, se incorpora en bajas cantidades en el virión (Baudoux y col., 1998). Se trata de una proteína integral de membrana, fuertemente hidrofóbica de la que inicialmente se creía que era indispensable en la formación de la envuelta, junto con la proteína M (Baudoux y col., 1998). La emergencia del SARS-CoV aumentó el interés hacia esta proteína, al determinarse que es una viroporina (forma canales iónicos) permeable a cationes sodio (Wilson y col., 2004, 2006), en el caso del SARS-CoV (Wilson y col., 2004) y a cationes potasio (Wilson y col., 2006), en el caso del TGEV, aunque su función en el ensamblaje viral sigue abierta.

### 1.1.2.5. PROTEÍNA N

La proteína N en el TGEV tiene un tamaño de 43.5 kDa y se encuentra fosforilada en los CoVs que se ha estudiado esta modificación post-traducciona (Stohlman y Lai, 1979; Lomniczi y Morser, 1981; King y Brian., 1982; Zakhartchouk y col., 2005; Chen y col., 2005), incluido el TGEV (Calvo y col., 2005). La proteína N consta de tres dominios diferenciados, uno de los cuales es un dominio de unión a RNA, separados por regiones espaciadoras (Parker y Masters, 1990). La proteína N se une tanto al genoma como a los RNAs subgenómicos con alta afinidad (Nelson y col., 2000), dado que es la encargada de empaquetar el genoma para formar la nucleocápsida del virus (Baric y col., 1988; Nelson y Stohlman, 1993). Adicionalmente, se ha implicado en funciones como la transcripción (Baric y col., 1988; Choi y col., 2002; Almazán y col., 2004), la traducción (Tahara y col., 1994) y la replicación (Thiel y col., 2001; Yount y col., 2002; Almazán y col., 2004; Schelle y col., 2005). Recientemente se ha descrito que la proteína N actúa como una chaperona de RNA en el TGEV y el SARS-CoV (Zúñiga y col., 2006). Esta chaperona facilitaría el cambio de molde requerido durante la transcripción discontinua en CoVs.

### 1.1.2.6. PROTEÍNAS NO ESTRUCTURALES

Las proteínas del complejo de la replicasa se generan por traducción de las ORFs 1a y 1b. La ORF 1b solapa parcialmente con la ORF 1a, y se expresa por un salto de fase de lectura, un mecanismo que sólo se había descrito previamente en retrovirus (Jacks y col.,

1988). La traducción de ambas ORFs genera dos poliproteínas, pp1a y pp1ab, de entre 440 a 500 kDa y de 740 a 810 kDa, respectivamente. Estas poliproteínas son procesadas co-traduccionalmente por tres proteasas internas. Los productos finales del corte proteolítico en *cis* son 16 proteínas no estructurales, denominadas nsp1 a nsp16. Se trata de las proteínas implicadas en replicación y transcripción, entre las que se incluyen actividades enzimáticas como proteasas, RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp), helicasa, exorribonucleasa, endorribonucleasa y metiltransferasa (Enjuanes y col., 2007).

#### 1.1.2.7. PROTEÍNAS ACCESORIAS

Entre los genes estructurales de CoVs se intercalan ORFs que codifican proteínas no esenciales, que son características de cada especie o de grupos filogenéticamente relacionados.

La ORF 3a y 3b (3a/b) se encuentra entre los genes S y E del TGEV y puede delecionarse en el genoma sin que se afecte la viabilidad del virus (McGoldrick y col., 1999). Existen variantes naturales del TGEV que no expresan los genes 3a ó 3b, sin que su replicación se afecte *in vivo*. En el SARS-CoV, el gen 3a codifica una proteína estructural (Ito y col., 2005) que forma un canal iónico en la membrana del virus (Lu y col., 2006).

La última ORF del genoma del TGEV es la ORF 7. Se trata de un polipéptido hidrofóbico de 14 kDa que nunca ha sido detectado en viriones (Garwes y col., 1989). Aunque su función es desconocida, se ha sugerido su posible implicación en la patogénesis del virus *in vivo* (Garwes y col., 1989; Ortego y col., 2003).

En el SARS-CoV existen siete u ocho genes accesorios, dos entre los genes de las proteínas S y M (3a y 3b), de cuatro a cinco entre los genes M y N (6, 7a, 7b, 8a y 8b) y la ORF 9b, que solapa completamente con el gen de la proteína N (Enjuanes y col., 2007). Se ha comprobado que alguno de estos genes (3b y 6) contrarrestan las defensas del hospedador (Kopecky-Bromberg y col., 2006; Frieman y col., 2007).

#### 1.1.3. CICLO VIRAL

La infección por CoVs se inicia con la unión del virus al receptor celular. La interacción de la proteína S con el receptor es el principal determinante del tropismo *in vivo*. Para la mayoría de los CoVs del grupo 1, incluido el TGEV, el receptor celular es la aminopeptidasa N (Delmas y col., 1992; Yeager y col., 1992; Tresnan y col., 1996). Se trata de una proteasa expuesta en la superficie celular que contribuye a la digestión de pequeños

péptidos en el epitelio entérico y respiratorio. La porción más variable (S1), de las dos que forman la proteína S, es la que se une al receptor. La unión provoca un cambio conformacional en la región más conservada de la proteína S (S2) que permite la fusión entre las membranas de la célula y del virión (Nash y Buchmeier, 1997).

La nucleocápsida se libera al citoplasma en la célula infectada. El RNA genómico actúa como un mRNA, traduciendo la ORF 1a y la ORF 1ab, lo que genera la poliproteína que se procesará en *cis* por proteasas virales, produciendo las proteínas del complejo de replicación, junto con proteínas celulares.

La proteína M se traduce en ribosomas asociados a las membranas del retículo endoplasmático, se inserta en estas membranas y pasa al complejo *trans*-Golgi. En este compartimento recluta a la proteína S y se une directamente a la proteína E (Lim y Liu, 2001). La proteína N unida al RNA genómico formaría la nucleocápsida helicoidal que se incorpora a los viriones por interacción con la proteína M (Sturman y col., 1980; Narayanan y col., 2000; Escors y col., 2001). La maduración de los viriones es un proceso poco conocido. Los viriones maduros se transportan a través del Golgi. Una vez en la membrana plasmática, fusionan las membranas de las vesículas que los contienen con la de la célula y son liberados al espacio extracelular.

## **1.2. GENOMAS DEFECTIVOS**

Los genomas defectivos o minigenomas son mutantes de delección generados a partir de genomas virales infectivos por un error de replicación. Estos genomas se replican y encapsidan en partículas virales por complementación con virus competentes que les aportan la maquinaria de replicación y las proteínas estructurales. En algunos casos, la replicación de los genomas defectivos interfiere con la del genoma parental, denominándose partículas defectivas interferentes (DIs). Existen partículas DIs de una gran variedad de virus de animales y de plantas, que requieren la co-infección del virus parental para replicarse (virus complementador) e interfieren específicamente con el virus complementador homólogo, al replicarse utilizando sus recursos (Huang y Baltimore, 1970). El significado biológico de estos DIs-RNAs podría ser la atenuación del daño celular causado por el virus complementador, favoreciéndose una infección persistente.

Los genomas defectivos se han utilizado frecuentemente en coronavirus como herramienta para la localización de señales de replicación y encapsidación (Makino y col., 1990; Fosmire y col., 1992; Kim y col., 1993; Lin y Lai, 1993; Penzes y col., 1994; Chang y col., 1994; Luytjes y col., 1996; Bos y col., 1997; Woo y col., 1997; Cologna y Hogue, 2000; Narayanan y Makino, 2001). Una ventaja para la utilización de minigenomas en la identificación de señales en *cis* para replicación y encapsidación es que estas funciones pueden evaluarse independientemente de otras funciones de la misma secuencia.

### **1.2.1. GENOMAS DEFECTIVOS DERIVADOS DE CORONAVIRUS**

Los genomas defectivos pueden aparecer de manera espontánea o, más frecuentemente, por pases seriados del virus a alta multiplicidad de infección (mdi) en cultivos celulares. Los primeros minigenomas de CoVs se obtuvieron por pases seriados del virus MHV-JHM en cultivos celulares (Makino y col., 1984). Las partículas defectivas derivadas de este virus se han dividido en tres tipos, dependiendo de su capacidad de replicación y encapsidación. El primero lo constituye el RNA DissA (Makino y col., 1985), de tamaño muy parecido al genómico, que es empaquetado eficientemente en partículas virales y replica en ausencia de virus complementador, es decir, es un RNA autorreplicativo (Makino y col., 1988; Kim y Makino, 1995). El segundo tipo lo forman RNAs más pequeños que requieren del virus complementador para replicar, y encapsidan con baja eficiencia. Un ejemplo de este grupo es el RNA DissE, de 2.2 Kb (Makino y col., 1988). Los minigenomas del tercer tipo también requieren de la infección con el virus complementador para su replicación, pero encapsidan eficientemente. El prototipo de este grupo es el RNA DissF, de 3.6 kb (Makino y col., 1990).

Todos estos RNAs defectivos tienen en común el haber mantenido los extremos 5' y 3' del genoma parental y algunas regiones internas. Esta estructura se mantiene, en líneas generales, en los genomas defectivos aislados posteriormente de los CoVs MHV-A59 (Van der Most y col., 1991), BCoV (Hofmann y col., 1990), IBV (Penzes y col., 1994) y TGEV (Méndez y col., 1996).

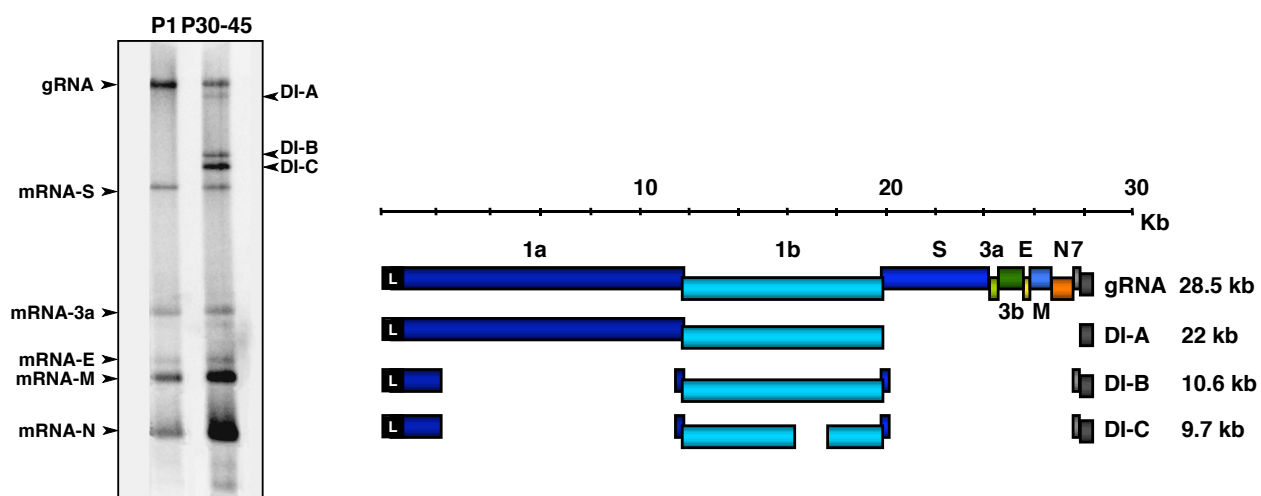
### **1.2.1. GENOMAS DEFECTIVOS DERIVADOS DEL TGEV**

Para estudiar la generación de RNAs defectivos en el TGEV se dieron pases seriados del virus a alta mdi en células ST, con la finalidad de promover la generación de partículas defectivas (Méndez y col., 1996) y se analizó el patrón de RNAs a lo largo de los pases. En

## introducción

los primeros pases sólo se detectó el RNA genómico y los mRNAs subgenómicos virales. A partir de pase P30 se detectaron tres RNAs defectivos de 22 kb, 10.6 kb y 9.7 kb, que se denominaron DI-A, DI-B y DI-C, respectivamente (Fig. 2). Estos RNAs subgenómicos se mantuvieron de forma estable durante 15 pases más.

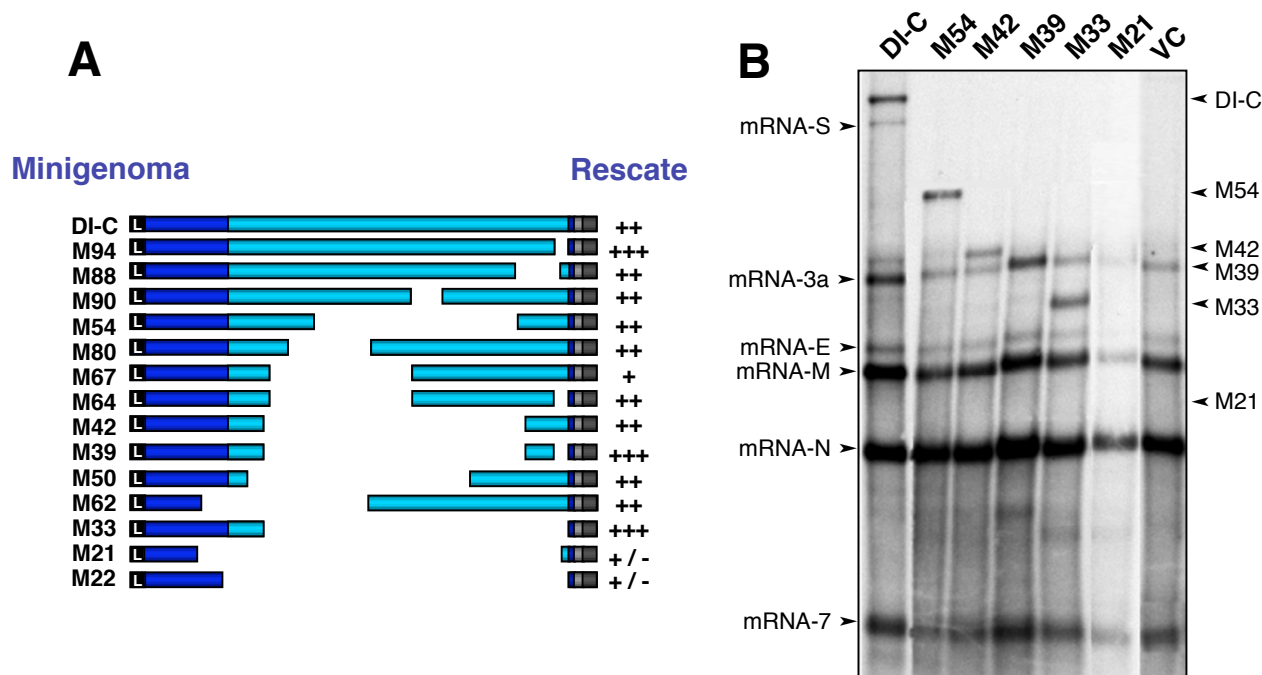
Para estudiar la encapsidación de los RNAs defectivos, se hizo una purificación parcial de los virus de pase P1 y de pase P41 mediante centrifugación en un colchón de sacarosa. Se extrajo el RNA de los viriones purificados y se analizó la presencia de los genomas defectivos generados, observándose que se encontraban en la misma proporción que el



**Figura 2. Minigenomas naturales derivados del TGEV (Méndez y col., 1996).** Las partículas defectivas interferentes DI-A, DI-B y DI-C se obtuvieron después de 40 pases del TGEV a alta mdi en células ST. A la izquierda se muestra un *Northern blot* en el que se indica el patrón de RNAs virales producido por las células infectadas, que incluyen los mRNAs virales y los RNAs de los minigenomas. Los RNAs se hibridaron con una sonda complementaria a la región 3'-UTR. A la izquierda de la imagen se indica la posición del RNA genómico (gRNA) y los mRNAs virales y a la derecha la posición de los RNAs DI-A, DI-B y DI-C. El esquema de la derecha representa las secuencias del genoma completo del TGEV y cada uno de los genomas defectivos. La longitud de cada molécula está indicada a la derecha, en kb. L, líder; 1a y 1b, ORFs 1a y 1b del gen de la replicasa; S, E, M y N, genes de las proteínas estructurales; 3a, 3b y 7, genes de las proteínas accesorias.

genoma, por lo que se dedujo que los RNAs encapsidaban eficientemente (Méndez y col., 1996). Asimismo, se comprobó que los genomas DI-B y DI-C encapsidaban en partículas diferentes al genoma, más ligeras que los viriones estándar, mediante una purificación en gradientes continuos y discontinuos de sacarosa (Méndez y col., 1996).

El genoma defectivo más pequeño generado (DI-C) se utilizó para construir una colección de minigenomas sintéticos y estudiar los requerimientos necesarios para el rescate en *trans* con un virus complementador (Izeta y col., 1999) (Fig. 3). Los minigenomas rescatados en cultivos celulares contenían las secuencias mínimas necesarias para ser replicados en *trans* y para su encapsidación. El minigenoma más pequeño con un eficiente rescate fue M33, debiendo contener las señales mínimas para su replicación y encapsidación por el virus complementador.



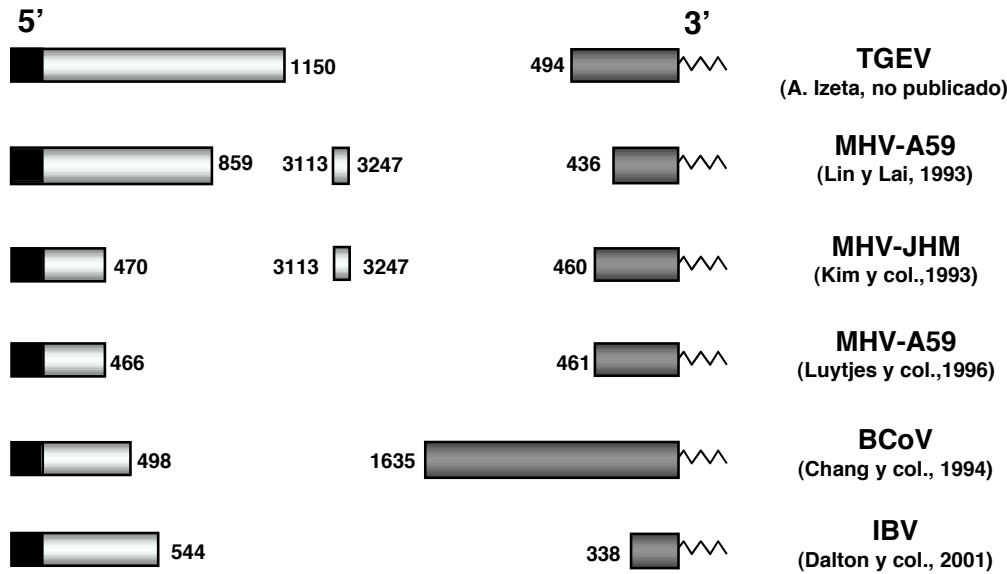
**Figura 3. Minigenomas sintéticos derivados del TGEV (Izeta y col., 1999).** (A) Esquema de los minigenomas generados a partir del genoma defectivo natural DI-C. El rescate mediante un virus complementador se evaluó por experimentos de transferencia e hibridación de RNAs. La eficiencia de rescate de los minigenomas se estimó como la relación molar de cada genoma defectivo respecto al mRNA del gen E del virus complementador. Los minigenomas detectados en un exceso molar de 10 veces se indican como (+++), 5 veces como (++) y una relación molar menor que 1 como (+). La eficiencia de rescate de los minigenomas M21 y M22 se indica como (+/-), puesto que no fueron detectados por la técnica de hibridación de RNAs pero sí por reacciones de RT-PCR. L, líder. (B) Experimento de transferencia e hibridación (*Northern blot*) de los RNAs de minigenomas rescatados por el virus complementador TGEV PUR46-MAD en el pase P8. Las posiciones de las bandas de los minigenomas se indican a la derecha. La posición de los mRNAs del virus complementador se indica a la izquierda. VC, virus complementador.

### 1.3. SÍNTESIS DE RNA

1.3.1. REQUERIMIENTOS DE SECUENCIA

En la replicación del genoma de CoVs, como en el resto de virus RNA de cadena positiva, inicialmente el genoma se copia en un RNA de polaridad negativa, que actúa como molde para la síntesis continua de los genomas de la progenie. La replicación necesita del reconocimiento de los extremos 5' y 3' del RNA genómico por las proteínas virales y celulares. Los estudios con RNAs defectivos interferentes en el MHV indican que se requieren 466 nt y 461 nt (Lin y Lai, 1993), 470 nt y 460 nt (Kim y col., 1993) y 859 nt y 436 nt (Luytjes y col., 1996) de los extremos 5' y 3', en cada caso, para la replicación de estos DI RNAs (Fig. 4). Adicionalmente, en algunos trabajos se ha descrito el requerimiento de una secuencia interna de 134 nt a 3 kb del extremo 5' (Lin y Lai, 1993; Kim y col., 1993) mientras que en otros estudios se descarta el requerimiento de esta región para la replicación del MHV (Luytjes y col., 1996) (Fig. 4).

El análisis de DI-RNAs derivados de un CoV relacionado (BCoV) determinó que 498 nt y 1635 nt en los extremos 5' y 3', respectivamente, son necesarios para la replicación de los genomas defectivos (Chang y col., 1994). En el IBV se ha descrito que 544 nt en el extremo



**Figura 4. Secuencias de los extremos 5' y 3' del genoma requeridas para la replicación de coronavirus.** Se representa esquemáticamente la longitud de las secuencias de los extremos 5' y 3' del genoma necesarias para la replicación de coronavirus de los grupos 1 (TGEV), 2 (MHV-A59, MHV-JHM y BCoV) y 3 (IBV). En las secuencias del extremo 5' (gris claro) y 3' (gris oscuro) los números indican el número de nt contados desde los extremos 5' ó 3', respectivamente. En la columna de la izquierda se indican las referencias bibliográficas.



5' y 338 nt en el extremo 3' son suficientes para la replicación de minigenomas derivados del virus (Dalton y col., 2001) (Fig. 4). Los extremos 5' y 3' del genoma son necesarios para la síntesis de la cadena positiva de RNA, mientras que solamente 55 nt del extremo 3' y la cola de poli-A se requieren para la síntesis de la cadena negativa del MHV (Lin y col., 1994).

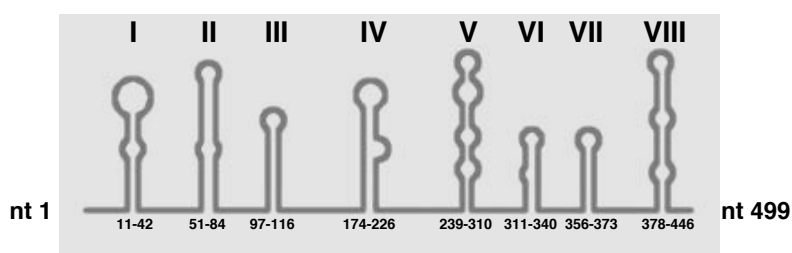
El requerimiento de secuencias para la replicación de DI-RNAs derivados del TGEV se estudió mediante el análisis de la expresión de un gen trazador GUS ( $\beta$ -glucuronidasa) transcrito por los genomas defectivos, encontrándose que las señales mínimas de replicación se encontraban en los 1150 nt del extremo 5' y 494 nt del extremo 3' (A. Izeta y L. Enjuanes, resultados no publicados) (Fig. 4). No obstante, la replicación de minigenomas con esta secuencia era dos unidades logarítmicas menos eficiente que la del minigenoma M33, con una región 5' más extensa. Además, estos resultados no eran concluyentes debido a que se habían obtenido mediante medidas indirectas (expresión de  $\beta$ -glucuronidasa), puesto que, además de la replicación del minigenoma, se requieren la transcripción y la traducción del gen trazador.

#### 1.3.1.1. ESTRUCTURAS DE RNA IMPLICADAS EN LA REPLICACIÓN DEL GENOMA DE CORONAVIRUS

La región mejor caracterizada por análisis de estructura secundaria del genoma de coronavirus, gracias a los extensos estudios realizados en coronavirus del grupo 2 (MHV y BCoV), es el extremo 3' del RNA genómico (gRNA). El extremo 3' del gRNA consta de una estructura en horquilla en la región 3'-UTR (Hsue y Masters, 1997; Hsue y col., 2000; Goebel y col., 2004) y de un falso lazo (*pseudoknot*) adyacente (Williams y col., 1999; Goebel y col., 2004). Ambas estructuras, necesarias para la replicación, solapan parcialmente y no pueden encontrarse plegadas simultáneamente (Masters, 2006). La estructura en horquilla no se encuentra en los coronavirus del grupo 1, que si poseen el falso lazo (Williams y col., 1999). En contraste, los coronavirus del grupo 3, incluyen la estructura en horquilla y no tienen el falso lazo (Dalton y col., 2001).

Los motivos de estructura secundaria del RNA del extremo 5' se han estudiado mayoritariamente en el BCoV. Se han identificado seis estructuras en horquilla (*stem loops*) (SL I a SL VI) esenciales para la replicación (Fig. 5), a excepción de la estructura V, para la que no se ha confirmado su papel en replicación, mediante experimentos de digestión con RNAsas que determinan motivos de RNA, y mutaciones funcionales de estos motivos

(Chang y col., 1994; Raman y col., 2003; Raman y Brian, 2005; Brown y col., 2007). Solamente alguna de estas estructuras (motivo III) estarían conservadas en el resto de coronavirus, según predicciones *in silico* de estructura secundaria (Kang y col., 2006). En el SARS-CoV se ha confirmado la existencia de las estructuras I y III donde, además, existe un motivo estructural adicional entre las horquillas II y III (Kang y col., 2006). Las estructuras SL V y VI sólo se encuentran conservadas entre los coronavirus del grupo 2 (Brown y col., 2007).



**Figura 5.** Esquema de la predicción de estructura secundaria del RNA del extremo 5' del BCoV (Chang y col., 1994; Raman y col., 2003; Raman y Brian, 2005; Brown y col., 2007). Se representan esquemáticamente los motivos de estructura secundaria descritos para el BCoV en los primeros 499 nt del extremo 5' del genoma. Se indica en numeración romana cada una de las horquillas de RNA. En la parte inferior se muestra la posición (en nt) de cada motivo de RNA a lo largo de la secuencia previstas.

### 1.3.2. PROTEÍNAS NECESARIAS PARA LA REPLICACIÓN DE CORONAVIRUS

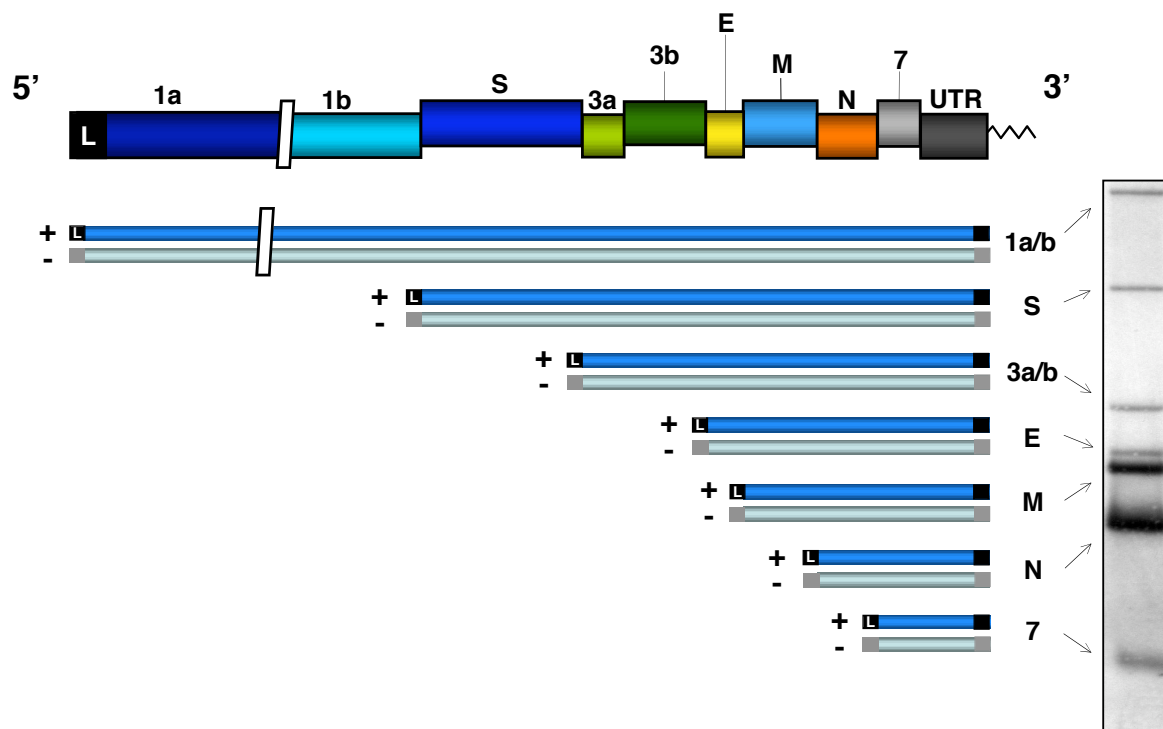
En el complejo de replicación de coronavirus intervienen la RNA polimerasa y la helicasa virales, el resto de proteínas generadas por el procesamiento proteolítico de las poliproteínas pp1a y pp1ab (nsp1 a nsp16), y proteínas celulares (Ziebuhr y Snijder, 2007; Enjuanes y col., 2007). Además de las proteínas nsps codificadas por el gen de la replicasa, varios estudios han implicado, también, a la proteína N en la síntesis del RNA en coronavirus (Thiel y col., 2001; Yount y col., 2002; Almazán y col., 2004; Schelle y col., 2005). El complejo de replicación estaría asociado a membranas intracelulares modificadas, que crean un entorno óptimo para la síntesis del RNA viral y para el reclutamiento de factores del huésped. Estudios de microscopía electrónica han mostrado que la síntesis de RNA se produce en vesículas de doble membrana inducidas por el virus (Snijder y col., 2006). El origen de estas membranas se cree que está en diferentes compartimentos intracelulares, aunque todavía no hay estudios concluyentes.

Estudios sobre la replicación del MHV realizados con DI-RNAs han mostrado que mientras que los extremos del genoma de MHV son necesarios para la síntesis de la cadena positiva, para la síntesis de la cadena de polaridad negativa sólo son necesarios los últimos 55 nt y la cola de poli-A presente en el extremo 3' del genoma (Lin y col., 1994). Ello ha llevado a postular que los extremos 5' y 3' del genoma pueden interaccionar durante la replicación del genoma, tal como se ha predicho por las interacciones intramoleculares durante el plegamiento del genoma RNA en un medio libre de proteínas, utilizando simulaciones mediante programas de ordenador (Sgro y col., 2004). Dado que no hay complementariedad evidente entre las secuencias de los extremos 5' y 3' del genoma de coronavirus, la interacción entre ambos extremos podría estar mediada por proteínas. Existen evidencias experimentales en el MHV (Huang y col., 2001) y en el TGEV (C. Galán, F. Almazán y L. Enjuanes, resultados no publicados) que apoyan que la interacción entre los extremos 5' y 3' está mediada por proteínas mediante uniones RNA-proteína y proteína-proteína. En este sentido se ha identificado la ribonucleoproteína heterogénea nuclear (hnRNP) A1, la proteína de unión a tractos de pirimidinas (PTB) y la proteína N de CoV, como proteínas potencialmente mediadoras de la unión entre los extremos 5' y 3' con relevancia en la replicación del genoma (Shi y col., 2000; Huang y col., 1999; Almazán y col., 2004; Schelle y col., 2005; C. Galán, F. Almazán y L. Enjuanes, resultados no publicados).

### **1.3.3. SÍNTESIS DISCONTINUA DE RNA: TRANSCRIPCIÓN DE RNAs SUBGENÓMICOS**

La transcripción en CoV y, en general en el orden Nidovirales, es una síntesis de RNA dependiente de RNA incluyendo un paso de síntesis discontinua durante la producción de la cadena negativa complementaria a los mRNAs subgenómicos (Spaan y col., 1983; Lai y Cavanagh, 1997; Sawicki y Sawicki, 1998; Zúñiga y col., 2004; Sola y col., 2005). Este proceso de transcripción genera, en última instancia, un sistema jerarquizado de mRNAs subgenómicos policistrónicos, funcionalmente monocistrónicos, que son 5' y 3' co-terminales con el genoma del virus (Fig. 6). El extremo común de la secuencia 5' terminal es el líder, que en el TGEV tiene 93 nt. Durante la producción de RNAs subgenómicos de polaridad negativa, que sirven como molde para la generación de la cadena positiva, se fusiona la copia del líder al extremo 3' de la cadena de RNA naciente de polaridad negativa, que es complementaria a la secuencia codificante del mRNA (*body* o B), por el

mecanismo discontinuo de la transcripción. Las secuencias que preceden a cada gen y representan las señales para la transcripción discontinua de los mRNAs subgenómicos se denominan secuencias reguladoras de la transcripción (TRSs) e incluyen: (i) una secuencia conservada (CS), que en el TGEV es 5' - CUAAAC - 3', idéntica para todos los genes (CS-B), y (ii) las secuencias 5' y 3' flanqueantes a la CS, 5' TRS y 3' TRS, respectivamente (Alonso y col., 2002; Sola y col., 2005). La CS también se encuentra en el extremo 3' de la secuencia del líder (CS-L), y puede aparearse con la cadena negativa complementaria a cada CS del gen (cCS-B). De hecho, el requisito de complementariedad de bases para la transcripción ha sido demostrado en arterivirus (Pasternak y col., 2001; van Marle y col., 1999) y en coronavirus (Zúñiga y col., 2004; Sola y col., 2005).



**Figura 6. Esquema del genoma del TGEV y de los mRNAs transcritos por el virus.** El dibujo superior muestra el RNA genómico del TGEV con todas las ORFs que codifican las proteínas virales. En la parte inferior de la figura se esquematizan los mRNAs subgenómicos generados por un mecanismo de transcripción en el citoplasma de células infectadas. Los mRNAs son 5' y 3' co-terminales. En el extremo 5' contienen la secuencia líder procedente del extremo 5' del genoma y en el extremo 3', la región 3'-UTR no traducida. Aunque los mRNAs son estructuralmente policistrónicos, excepto el del gen 7, funcionalmente se comportan como monocistrónicos, puesto que sólo traducen la ORF situada más al extremo 5'. A la derecha de la figura se muestra el patrón de RNAs virales de células infectadas, detectado en experimentos de transferencia de RNAs e hibridación (*Northern blot*) con una sonda complementaria al extremo 3'-UTR del TGEV.

Los datos obtenidos hasta la fecha son compatibles con un modelo de la transcripción incluyendo tres pasos: (i) formación del complejo de iniciación de la transcripción, (ii) evaluación de la complementariedad de la cadena negativa del RNA naciente con la TRS del líder, y (iii) cambio de molde en la síntesis de la cadena negativa para copiar el líder y terminar el RNA subgenómico (sgRNA), después de copiarse la secuencia de la CS. La síntesis de mRNAs se produce solamente cuando la CS está en un contexto óptimo de secuencias (Zúñiga y col., 2004; Sola y col., 2005). Se ha demostrado que el apareamiento de bases entre la TRS del líder y la cadena naciente de RNA de polaridad negativa es un factor determinante en la transcripción de coronavirus (Sola y col., 2005).

#### 1.3.3.1. REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN

La proximidad al extremo 3' condiciona la cantidad relativa de cada mRNA viral, puesto que la polimerasa encuentra menos señales de detención en la síntesis de la cadena negativa. Aunque esto es así en la mayoría de coronavirus, los niveles de los diferentes mRNAs no están estrictamente relacionados con la proximidad al extremo 3' (van der Marle y col., 1995), existiendo otros factores que regulan la transcripción, como la complementariedad de bases entre la secuencia complementaria a la TRS del mRNA y el líder. Así, la cantidad de cada mRNA es directamente proporcional a la energía libre liberada ( $\Delta G$ ) en el apareamiento de bases (Zúñiga y col., 2004), descrito anteriormente. Asimismo, en el TGEV se ha localizado una secuencia activadora de la transcripción (*enhancer*) del gen N (Moreno y col., 2007). Por tanto, el orden de abundancia de los mRNAs del TGEV está relacionado con su cercanía al extremo 3', aunque éste no es el único parámetro determinante puesto que el mRNA-N es más abundante que el mRNA del gen 7, más cercano al extremo 3' del genoma viral.

Ciertas proteínas celulares también afectan la transcripción en coronavirus. Por ejemplo, se ha demostrado que dos proteínas celulares y una proteína viral pueden afectar la transcripción: hnRNP A1 (Li y col., 1997; Shi y col., 2000), PTB (Huang y col., 1999; Li y col., 1999), y la proteína N (Baric y col., 1988; Stohlman y col., 1988). Estas proteínas interaccionan con el gRNA y la cadena complementaria de polaridad negativa y, también, entre si. La interacción entre las proteínas hnRNP A1 y la PTB (Huang y col., 2001), las proteínas hnRNP A1 y la N (Wang y Xhang., 1999), y las proteínas PTB y la N (Choi y col., 2002) se ha documentado. El grado de unión de la hnRNP A1 con secuencias TRS se correlacionó con la eficiencia de la transcripción en el modelo del MHV (Zhang y Lai,

1995). Análogamente, la unión de la proteína PTB al líder del genoma de MHV o a la secuencia 3'-UTR se relacionó con la capacidad de transcripción de mRNAs (Huang y Lai, 1999; Li y col., 1999). La proteína N del MHV se une a la secuencia líder de los mRNAs y se ha demostrado su implicación en transcripción en el modelo de MHV (Baric y col., 1988; Stohlgman y col., 1988). Las proteínas N del TGEV y del SARS-CoV tienen actividad de chaperonas de RNA (Zúñiga y col., 2006). Éstas son proteínas que unen RNA con alta especificidad y disminuyen la energía de activación requerida para una transición entre dos estados dúplex de RNA: los formados por el genoma y la cadena complementaria naciente de polaridad negativa y el resultante de hibridar esta cadena negativa con la TRS del líder. La proteína N podría actuar disminuyendo la energía requerida para la transición del primer al segundo dúplex (Zúñiga y col., 2006).

### **1.3.4. RECOMBINACIÓN**

La recombinación entre moléculas de RNA frecuentemente se produce por un mecanismo de cambio de molde (Kirkegaard y Baltimore, 1986). En este proceso, la polimerasa viral separa la cadena naciente del molde y continúa la elongación en la misma posición, o en otra similar, pero copiando desde un molde diferente.

Durante la síntesis de RNA en coronavirus se ha demostrado una alta tasa de recombinación RNA-RNA homóloga y no homóloga en el curso de la infección. Aunque la mayoría de los estudios de recombinación en coronavirus se han realizado en el MHV (Keck y col., 1987, 1988; Makino y col., 1986, 1987), se ha observado una alta frecuencia de recombinación homóloga en prototipos de los tres grupos de los coronavirus: TGEV (Sánchez y col., 1999), FIPV (Haijema y col., 2003; Herrewegh y col., 1998), BCoV (Chang y col., 1996) e IBV (Kusters y col., 1990; Wang y col., 1993; Kottier y col., 1995). Adicionalmente, la recombinación no homóloga es el mecanismo por el cual los coronavirus han adquirido los genes accesorios.

En el MHV, la recombinación ocurre a lo largo de toda la secuencia del genoma con la más alta frecuencia observada para un virus RNA (Baric y col., 1990). Los sitios de recombinación son aleatorios (Banner y Lai, 1991), aunque una presión selectiva puede dar la impresión equivocada de la existencia de puntos con una mayor tasa de recombinación (Banner y col., 1990). Algunos resultados sugieren que la tasa de recombinación se incrementa a lo largo del genoma de MHV desde el extremo 5' hasta el 3' (Fu y Baric, 1992, 1994). Este gradiente se produce como resultado de la recombinación homóloga entre

el RNA genómico y los RNAs subgenómicos, puesto que estos últimos constituyen un conjunto de donadores y aceptores de molde más numerosos en función a su proximidad al extremo 3' (Fu y Baric, 1992, 1994).

Los estudios realizados apoyan un modelo de recombinación de virus RNA con tres requerimientos (Lai, 1992): (i) la RNA polimerasa debe pararse durante la síntesis. Ésta puede ser una propiedad intrínseca del enzima o puede ocurrir por la existencia en el molde de una estructura secundaria que dificulte el avance de la polimerasa. (ii) Debe existir un nuevo molde con proximidad física. (iii) El nuevo molde debe permitir la transferencia de la cadena naciente y la continuación de la síntesis. El modelo de transcripción de coronavirus, descrito en el apartado 1.3.3., podría facilitar los procesos de recombinación entre hebras de RNA, lo que explicaría la alta tasa de recombinación de estos virus.

#### **1.4. ENCAPSIDACIÓN DE GENOMAS VIRALES**

Una de las etapas iniciales en el ensamblaje de virus RNA es la interacción entre el RNA genómico y la proteína que dirige la formación de la nucleocápsida o ribonucleoproteína. Para muchas especies de virus, este paso requiere únicamente la interacción del RNA con la proteína de la cápsida, sin embargo, en los virus con envuelta, como es el caso del TGEV, la formación de virus infectivos está mediada por la asociación de la ribonucleoproteína a membranas celulares. Es decir, en estos virus la proteína de la cápsida, además, interacciona con otras proteínas virales para formar viriones.

La mayoría de virus RNA de polaridad positiva sintetizan el RNA genómico y mRNAs subgenómicos en el citoplasma de las células infectadas. Los virus RNA que infectan células eucariotas y se ensamblan en el citoplasma, tienen la posibilidad de co-empaquetar RNAs celulares. No obstante, los viriones maduros contienen mayoritariamente el RNA genómico viral. Asimismo, algunos virus, como el VIH, pueden encapsidar tRNAs (Cen y col., 2002) u otros RNAs del hospedador (Muriaux y col., 2002; Onafuwa-Nuga y col., 2005; Rulli y col., 2007), así como RNAs del propio virus (Houzet y col., 2007). La formación de viriones infecciosos es un proceso cuidadosamente dirigido que mantiene un alto grado de precisión y especificidad: las subunidades proteicas requeridas interaccionan unas con otras y con los ácidos nucleicos virales (Berkowitz y col., 1996). La especificidad de este proceso, que fue observada por primera vez en los años sesenta, en experimentos *in vitro* con el virus del mosaico del tabaco (TMV) (Fritsch y col., 1973), la proporciona una región presente en el RNA encapsidado (señal de encapsidación). La secuencia de RNA

que confiere especificidad de encapsidación ha sido descrita, además de en el TMV, en otros virus RNA como el alfavirus Sindbis (Levis y col., 1986), el virus de la gripe (Tchatalbachev y col., 2001), los retrovirus HIV (Lever y col., 1989) y el MoMLV (Adam y Miller, 1988), y algunos coronavirus como el MHV (Narayanan y Makino, 2001) y el BCoV (Cologna y Hogue, 2000). Sin embargo, en el caso de los CoVs las observaciones experimentales no siempre avalan las conclusiones obtenidas (apartado 4.2.1. de *Discusión*).

Además de la especificidad de secuencia que promueve la encapsidación, existen otros parámetros que controlan la encapsidación de genomas virales. Uno de ellos es la dimensión de la cápsida, que impone un límite en la cantidad de ácido nucleico viral que puede ser acomodado. Como una regla simplificada, se ha comprobado, tanto en virus DNA como RNA, que los ácidos nucleicos más largos que exceden del 105% del tamaño del genoma de un virus estándar no pueden ser empaquetados aunque contengan señales (adenovirus y el virus el arrugado del nabo) (Brett y col., 1993; Qu y col., 1997).

### **1.4.1. EL PROCESO DE ENCAPSIDACIÓN**

El mecanismo de encapsidación no se conoce con precisión. Es conveniente distinguir entre encapsidación y empaquetamiento. En esta tesis se define el empaquetamiento como el proceso de formación de la nucleocápsida, es decir, la unión cooperativa de la proteína N al RNA viral. La encapsidación se define como la incorporación de la nucleocápsida en viriones. En los virus con envuelta los dos procesos son diferenciables. Por ejemplo, en virus RNA de polaridad negativa no segmentados, el gRNA y el sgRNA son empaquetados, pero sólo el gRNA es encapsidado (Masters, 2006).

La especificidad en la encapsidación del genoma viral y la del resto de RNAs subgenómicos sintetizados por el virus, aparentemente varía entre los diferentes miembros de la familia *Coronaviridae*. Así por ejemplo, viriones del MHV purificados en gradiente de sacarosa contenían exclusivamente RNA genómico (Makino y col., 1990). Sin embargo, viriones purificados mediante el mismo protocolo en el BCoV (Hofmann y col., 1990), TGEV (Sethna y col., 1989, 1991) e IBV (Zhao y col., 1993), aparentemente contenían cantidades significativas de RNAs subgenómicos, no pudiendo descartarse que la presencia de estos RNAs fuese debida a una purificación parcial del virus.

El empaquetamiento del genoma de coronavirus presumiblemente es iniciado por la proteína N, (Masters, 2006). De hecho, experimentos *in vitro* han demostrado la unión de la



proteína N de MHV a la señal de encapsidación (Molenkamp y Spaan, 1997). Sin embargo, otros experimentos también han demostrado que la proteína N de MHV se une específicamente a la secuencia líder, localizada en el extremo 5' del gRNA pero también de los RNAs subgenómicos (Stohlman y col., 1988; Nelson y col., 2000). No está claro si estas secuencias de unión de RNA representan un paso inicial de nucleación, permitiendo la unión de múltiples monómeros de proteína N, que darán lugar al empaquetamiento de estos RNAs, pero no necesariamente a una encapsidación.

La unión de la proteína N al RNA del líder, tanto del RNA genómico como de los mRNAs virales, está de acuerdo con la observación de que anticuerpos anti-N co-inmunoprecipitan tanto el gRNA como el sgRNA de células infectadas con el MHV (Baric y col., 1988; Cologna y col., 2000; Narayanan y col., 2000). Sin embargo, no todos los RNAs empaquetados por la proteína N son encapsidados (Makino y col., 1990). Esta diferencia se podría explicar por el papel propuesto para la proteína M en dar selectividad a la encapsidación (Narayanan y col., 2000). En efecto, anticuerpos dirigidos contra la proteína M de MHV co-inmunoprecipitan la fracción de la proteína N que está unida a gRNA pero no la que está unida a sgRNA (Narayanan y col., 2000). Adicionalmente, esta interacción específica N-M depende de la presencia de la señal de encapsidación en el MHV (Narayanan y Makino, 2001). En experimentos más recientes realizados en coronavirus se ha atribuido la selección de la señal de encapsidación a la proteína M. Virus análogos a partículas (VLPs) formados por las proteínas M y E, en ausencia de proteína N, sólo incorporaban moléculas de RNA heterólogas si incluían la señal de encapsidación (Narayanan y col., 2003). Estos resultados están de acuerdo con los estudios que indican que la proteína M adopta dos conformaciones en el virión del TGEV, encontrándose en una de ellas interaccionando con la nucleocápsida (Escors y col., 2001).

#### **1.4.2. UN MODELO DE ESTUDIO: LA SEÑAL DE ENCAPSIDACIÓN DE RETROVIRUS**

El proceso de encapsidación de retrovirus es, posiblemente, el mejor caracterizado, e implica el reconocimiento inicial de la estructura secundaria de la señal de encapsidación por la poliproteína Gag. La región de RNA necesaria y suficiente para la encapsidación de retrovirus se localiza en el extremo 5' e incluye nucleótidos de la región líder no traducida y del gen *gag*. En HIV-1, la estructura secundaria de esta región consta de cuatro motivos de RNA (SL1, SL2, SL3 y SL4) (McBride y Panganiban, 1996). Las estructuras SL1, SL3

y SL4 contribuyen a la encapsidación de HIV-1, mientras que el motivo SL2 no parece tener ningún papel en el proceso (Luban y Goff, 1994; Harrison y col., 1998; McBride y Panganiban, 1996, 1997).

La secuencia de la señal de encapsidación incluye el sitio donador de procesamiento (*splicing*) del sgRNA más largo, localizado en el motivo SL2. Esta característica permite al virus discriminar entre gRNA y sgRNA (sometido a procesamiento), puesto que el sgRNA ha perdido parte de la señal de encapsidación (McBride y Panganiban, 1997). El motivo SL3 se une a la nucleocápsida incluida en la poliproteína Gag, y supone la principal interacción entre una proteína viral y la señal de encapsidación (de Guzman y col., 1998; Zeffman y col., 2000). La delección de la horquilla SL3 reduce la eficiencia de encapsidación aproximadamente 20 veces (Harrison y col., 1998). El motivo SL4 se une débilmente a la nucleocápsida, por lo que se especula que su función sería la de estabilizar la estructura de la señal de encapsidación (Amarasinghe y col., 2001). El motivo SL1 parece contribuir a la encapsidación selectiva del genoma del virus, junto con las horquillas SL3 y SL4 (McBride y Panganiban, 1997). Además, la estructura SL1 se ha implicado en la dimerización de las dos copias del RNA encapsidado en cada partícula viral (Paillart y col., 1996).

La introducción de mutaciones que alteraban la estructura secundaria de las horquillas SL1, SL3 y SL4 reducía la eficiencia de encapsidación tres veces (McBride y Panganiban, 1997). Las mutaciones compensatorias para restaurar la estructura del RNA permitían una encapsidación eficiente, por lo que la estructura secundaria del RNA, además de la secuencia, es importante en el proceso de encapsidación.

El requerimiento de las estructuras de RNA SL1 y SL3 en el proceso de encapsidación es dependiente de la posición. En efecto, cuando se intercambiaban las posiciones de los motivos SL1 y SL3 en HIV-1 se obtenían eficiencias de encapsidación similares a las producidas por la delección de uno de los motivos (MacBride y Panganiban, 1997).

Adicionalmente, se ha observado que elementos de estructura secundaria situados en el flanco 5' de la señal de encapsidación descrita en HIV-1 (TAR y r-U5) también participan en la encapsidación del genoma. En concreto, la delección del motivo TAR reduce la eficiencia de encapsidación entre cinco y diez veces (McBride y col., 1997). Por tanto, puede existir más de una secuencia con función de encapsidación dentro de un mismo RNA. Alternativamente, estas secuencias flanqueantes podrían ser necesarias para el mantenimiento de la estructura secundaria de la señal de encapsidación.

### 1.4.3. SEÑALES DE ENCAPSIDACIÓN EN CORONAVIRUS

En CoVs, el estudio del empaquetamiento y encapsidación del genoma se ha realizado mediante rescate de DIIs-RNAs con un virus complementador. En algunos casos, estos RNAs contienen las secuencias requeridas para la replicación y la encapsidación. En el CoV de ratón MHV, la señal de encapsidación se localizó a 20 kb del extremo 5', en una secuencia de 191 nt (Makino y col., 1990; Fosmire y col., 1992). Esta secuencia puede reducirse a una región de 69 nt, suficiente para la encapsidación de los RNAs (Narayanan y Makino, 2001). La señal de encapsidación del MHV se encontraría, por tanto, dentro de la secuencia codificante de la proteína nsp15, al final del gen de la replicasa. La adición de esta señal a un RNA no viral, el gen trazador de la enzima cloranfenicol acetil transferasa (CAT), le confería la capacidad de encapsidarse en viriones, aunque de forma ineficiente (Woo y col., 1997). No obstante, otros datos apuntan a que esta señal de encapsidación no sería por si sola suficiente, sugiriendo la existencia en el genoma de otras señales *in cis* de encapsidación (Bos y col., 1997).

Estudios filogenéticos y de predicción de estructura secundaria han identificado una horquilla de 95 nt dentro de los 191 nt de la señal de encapsidación descrita originalmente para MHV (grupo 2a de coronavirus), muy conservada en todos los coronavirus del grupo 2a pero no en el SARS-CoV (grupo 2b) ni en los coronavirus de los grupos 1 y 3 (Chen y col., 2007). Estos datos indicarían que, posiblemente, la encapsidación de los coronavirus del grupo 2a se realiza por un mecanismo diferente a la del resto de coronavirus del grupo 2.

En el BCoV se ha descrito una región homóloga a la identificada en MHV implicada en encapsidación de minigenomas (Cologna y Hogue, 2000). Sin embargo, estos resultados contradicen otros datos previos en los que se observó una eficiente encapsidación de minigenomas que no llevaban esta secuencia (Chang y col., 1994).

En el virus IBV se ha localizado una señal de encapsidación en el genoma (Penzes y col., 1994) pero los resultados no son concluyentes, debiendo separarse los requerimientos de replicación de los de encapsidación (Dalton y col., 2001). Sin embargo, sí parece claro que la señal de encapsidación del IBV no estaría en la misma región que la descrita para MHV, puesto que únicamente los extremos 5' y 3' son requeridos para el rescate de minigenomas.

El acoplamiento entre replicación y encapsidación se ha observado previamente en otros virus RNA como flavivirus (Khromykh y col., 2001), picornavirus (Nugent y col., 1999) y

## *introducción*

más recientemente en el virus de la encefalitis equina venezolana (Volkova y col., 2006). El acoplamiento entre los procesos de replicación y encapsidación podría ser un mecanismo que asegurara la encapsidación del gRNA en los viriones, no así de otros RNAs presentes en la célula.

La localización de la señal de encapsidación en el TGEV se inició con el estudio de una colección de minigenomas derivados del mismo (Izeta y col., 1999). Los minigenomas capaces de rescatarse en cultivos celulares por a un virus complementador debían contener secuencias mínimas necesarias para la replicación y la encapsidación. El minigenoma más pequeño con eficiente rescate fue el RNA M33, luego este minigenoma debía contener en su secuencia la señal de encapsidación del TGEV. Esta información ha sido un punto de partida esencial para esta tesis.

***objetivos***



Los objetivos propuestos para esta tesis son los siguientes:

**1.** Análisis de los requerimientos mínimos de secuencia para la replicación y la encapsidación de minigenomas derivados del virus TGEV.

**1.1.** Estudio de las señales fundamentales para la replicación en el extremo 5'.

**1.2.** Localización de la señal o señales de encapsidación.

**2.** Análisis del posible acoplamiento entre los procesos de replicación y encapsidación en minigenomas derivados del virus TGEV.





*materiales y métodos*





## 2.1. CÉLULAS

### 2.1.1. LÍNEAS CELULARES

Para el crecimiento, la titulación y purificación del TGEV, así como para la transfección de plásmidos que expresaban minigenomas derivados del virus, se utilizaron células epiteliales de testículo embrionario de cerdo, ST (*swine testicle*) (McClurkin y Norman, 1966). Estas células se obtuvieron de L. Kemeny (*National Animal Disease Center*, Ames, Iowa, Estados Unidos).

Para la transfección de cDNAs recombinantes que codifican virus infectivos y del replicón del alfavirus Sindbis, se utilizaron células derivadas de riñón de cría de hamster, BHK (*baby hamster kidney*) que expresaban establemente la aminopeptidasa N porcina (Delmas y col., 1992), receptor celular para el virus TGEV. Estas células, abreviadas BHK-pAPN, fueron cedidas al laboratorio por H. Laude (*Unité de Virologie et Immunologie Moléculaires*, INRA, Jouy-en-josas, Francia).

### 2.1.2. CRECIMIENTO DE CÉLULAS EUCARIOTAS

Las células se cultivaron en medio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle medium*) suplementado con 50 mg/ml de gentamicina (Sigma), 2 mM de L-glutamina (Sigma), aminoácidos no esenciales al 1% (Sigma) y suero fetal de ternera o SFT (Cambrex) al 10% para el cultivo de células ST, o al 5% para el cultivo de la línea celular BHK-pAPN. En el medio de cultivo de las células BHK-pAPN se añadió 1 mg/ml de geneticina (Roche) cada 5-6 pases para mantener la expresión de la aminopeptidasa N, el receptor del virus. Para seleccionar las células BHK-pAPN que expresaban el replicón del virus Sindbis se añadieron 5 µg/ml de puromicina (Sigma) en todos los pases.

### 2.1.3. TRANSFECCIÓN TRANSITORIA DE CÉLULAS EUCARIOTAS

Para los experimentos de transfección se cultivaron células ST o BHK-pAPN, hasta alcanzar un 95% de confluencia, en placas de 35 mm de diámetro (NUNC) en medio DMEM suplementado según lo descrito en el apartado anterior, pero sin antibiótico. En el momento de la transfección, el medio de crecimiento se sustituyó por *OptiMEM* (Gibco BRL). Sobre la monocapa de células se añadió una mezcla de 4 µg de DNA plasmídico y 12 µl de Lipofectamina™ 2000 (Invitrogen), en un volumen de 500 µl de *OptiMEM* por placa. Los complejos de transfección se incubaron con las células 6 horas, agitándose cada

15 minutos durante la primera hora. Finalmente se retiró el medio de transfección y después de lavar las células 3 veces con medio DMEM sin suero, se reemplazó por medio completo.

#### **2.1.4. TRANSFECCIÓN ESTABLE DE CÉLULAS QUE EXPRESAN EL REPLICÓN DEL ALFAVIRUS SINDBIS**

Células BHK-pAPN se transfectaron con plásmidos que expresan el replicón del virus Sindbis según lo descrito en el apartado anterior. 24 horas después de la transfección las células se subcultivaron y se añadió 5  $\mu\text{g/ml}$  de puromicina en medio DMEM completo para la selección de las células que habían incorporado el plásmido. Las células BHK-pAPN que expresaban establemente el replicón de Sindbis se amplificaron y se congelaron para generar el *stock* de trabajo.

## **2.2. VIRUS**

### **2.2.1. AISLADOS VIRALES**

El aislado del virus de la gastroenteritis porcina transmisible PUR46-MAD (Sánchez y col., 1990) se utilizó como virus complementador en los protocolos de rescate y replicación de minigenomas en *trans* y en la infección de células BHK-pAPN que expresan el replicón del virus Sindbis. Este virus tiene su origen el aislado PUR46 obtenido en la Universidad de Purdue, Indiana (Doyle y Hutchings, 1946), que fue adaptado al crecimiento en cultivos celulares después de 115 pases en células ST (Haelterman y Pensaert, 1967) y fue cedido al laboratorio por E. H. Bohl (Ohio State University, Wooster, Ohio, Estados Unidos). En nuestro laboratorio este virus recibió 5 pases sucesivos en células ST, que incluyeron 3 pases de clonaje por purificación de placa, y se denominó PUR46-CC120-MAD ó, abreviadamente, PUR46-MAD. Este virus está atenuado *in vivo* y crece en cultivos celulares, con títulos comprendidos entre  $10^8$  y  $10^9$  UFP/ml (unidades formadoras de placa por ml).

En los experimentos de genética reversa con cDNAs recombinantes que expresan desde un cromosoma artificial bacteriano (BAC) el genoma de un virus infectivo (Almazán y col., 2000), se utilizó un virus recombinante que contiene el genoma del TGEV-PUR46-MAD en el que el gen S se ha reemplazado por el gen S de la estirpe PTV (*Purdue type virus*)

(Sánchez y col., 1999). En cultivos celulares este virus TGEV-PUR-S<sub>PTV</sub> alcanza títulos en torno a 10<sup>9</sup> UFP/ml.

### **2.2.2. CRECIMIENTO Y TITULACIÓN DEL VIRUS TGEV**

El virus TGEV se amplificó en células ST en medio de inóculo (DMEM con SFT al 2%), como se había descrito previamente (Correa y col., 1988).

El título viral se determinó por formación de placas de lisis en medio semisólido. Para ello se prepararon diluciones seriadas de orden 10 de los sobrenadantes virales con las que se infectaron células ST confluentes crecidas en placas de 24 pocillos (NUNC). El virus se adsorbió durante 1 hora y media y posteriormente se retiró el inóculo. Se añadió agar al 0.7% en medio DMEM suplementado con 2% de SFT, y las células se incubaron a 37°C durante 40 horas. Finalmente se retiró el agar y se fijaron las células con formaldehído al 10% en tampón fosfato salino o PBS (137 mM NaCl, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.7 mM KCl, pH 7.4). Las placas de lisis se tiñeron con una solución de cristal violeta al 0.1% en metanol-agua (1:4) y se contó el número de placas en cada dilución del virus. El título viral se expresó en UFP/ml.

### **2.2.3. RESCATE DE MINIGENOMAS EN *TRANS* CON UN VIRUS COMPLEMENTADOR**

Los plásmidos que expresan los minigenomas derivados del TGEV bajo el promotor de citomegalovirus (CMV) se transfectaron en células ST según el protocolo descrito en el apartado 2.1.3. Después de retirar los complejos de transfección, se infectó la monocapa de células con el virus TGEV-PUR46-MAD a una mdi de 5 en medio de inóculo. El virus se adsorbió durante una hora y media con agitación cada 15 minutos. Posteriormente se retiró el inóculo y se añadió DMEM con SFT al 2% sobre las células. A las 16-18 horas post-infección (hpi), un tercio del sobrenadante, denominado de pase P0, se añadió sobre una nueva monocapa confluyente de células ST, procediéndose de la misma forma durante los sucesivos pases.

### **2.2.4. RESCATE Y AMPLIFICACIÓN DEL RNA DE GENOMAS VIRALES RECOMBINANTES EXPRESADOS BAJO EL PROMOTOR DE CITOMEGALOVIRUS. OBTENCIÓN DE CLONES VIRALES**

Los plásmidos que expresan en forma de BAC el cDNA completo del virus TGEV-PUR-S<sub>PTV</sub>, o de los distintos recombinantes, se transfectaron según lo descrito en el apartado 2.1.3, en células BHK-pAPN, que presentan mayor eficiencia de transfección que las células ST. Después de retirar los complejos de transfección a las 6 horas post-transfección (hpt), las células se levantaron de la placa con tripsina (Gibco BRL) y se añadieron sobre una monocapa de células ST confluentes, en las que el virus crece más eficientemente. Transcurridas 48 horas, el virus de pase P0 liberado al sobrenadante se pasó 1 ó 2 veces en células ST para su amplificación.

El virus amplificado se clonó 3 veces consecutivas mediante el aislamiento de placas de lisis en medio semisólido. El virus clonado se amplificó 2 veces para obtener el *stock* de trabajo.

### **2.2.5. PURIFICACIÓN DEL VIRUS TGEV**

En las purificaciones descritas a continuación se tuvieron en cuenta las condiciones descritas previamente para co-purificar viriones con el genoma completo y viriones de menor densidad que contienen los minigenomas (Méndez y col., 1996).

#### **2.2.5.1. PURIFICACIÓN PARCIAL EN COLCHÓN DE SACAROSA AL 15%**

Células ST o BHK-pAPN se cultivaron en 2 placas de 150 mm de diámetro (NUNC) y se inocularon con el virus TGEV-PUR46-MAD o con el virus recombinante TGEV-PUR-S<sub>PTV</sub> con una mdi de 5 ó 10. Los sobrenadantes de células ST y BHK-pAPN infectadas se recogieron a las 18 hpi ó a las 24 hpi, respectivamente, y se aclararon de restos celulares mediante centrifugación en un rotor GSA de Sorvall a 6000 rpm durante 20 minutos a 4°C. Durante las etapas sucesivas de la purificación, el virus se mantuvo siempre a 4°C y no fue sometido a procesos de congelación-descongelación.

El sobrenadante clarificado se centrifugó 1 hora y 30 minutos en un rotor SW28 de Beckman a 25000 rpm sobre 5 ml de un colchón de sacarosa al 15% (p/v) en tampón TEN (Tris-HCl 10 mM pH 7.4, EDTA 1 mM, NaCl 1 M) con 0,2% del detergente Tween-20 (Sigma). Posteriormente, se aspiraron el sobrenadante y la sacarosa y el virus sedimentado se resuspendió en 500 µl de tampón TNE (Tris-HCl 10 mM pH 7.4, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM).

#### 2.2.5.2. PURIFICACIÓN PARCIAL EN GRADIENTE DISCONTINUO DE SACAROSA AL 15 Y 43%

Los virus recombinantes se amplificaron en células ST como se ha descrito en el apartado anterior. Los sobrenadantes se clarificaron por el procedimiento descrito para eliminar restos celulares.

El sobrenadante clarificado se centrifugó durante 1 hora y 30 minutos en un rotor SW28 de Beckman a 25000 rpm sobre 10 ml de un gradiente discontinuo de sacarosa del 15 y 43% (p/v) en tampón TEN con Tween-20 al 0.2%. El virus sedimentado en la interfase de las dos concentraciones de sacarosa se recogió por succión con una jeringa de 2 ml. El virus recuperado se centrifugó de nuevo en tampón TEN en un rotor SW41 de Beckman a 25000 rpm durante una hora para eliminar los restos de sacarosa. El virus sedimentado se resuspendió finalmente en 500  $\mu$ l de tampón TNE.

#### 2.2.5.3. PURIFICACIÓN EN GRADIENTE CONTINUO DE SACAROSA

Se cultivaron células ST en 20 placas de 150 mm de diámetro y se inocularon con el virus TGEV-PUR46-MAD a una mdi de 2.5. Los sobrenadantes de las células infectadas se recogieron a las 40 hpi y se clarificaron por centrifugación en un rotor GSA de Sorvall a 6000 rpm durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante clarificado se centrifugó en un rotor SW28 de Beckman a 25000 rpm sobre un colchón discontinuo de sacarosa del 15 y 43% (p/v) en tampón TEN con Tween-20 al 0.2%. El virus recogido de la interfase se volvió a centrifugar en un rotor SW28 de Beckman a 25000 rpm durante 2 horas a 4°C, sobre 30 ml de un gradiente continuo de sacarosa del 30-43% en tampón TEN. El gradiente de sacarosa se fraccionó en 20 alícuotas de 1.5 ml recogidas desde el fondo del tubo. Las fracciones que contenían el virus se identificaron por absorbancia de luz ultravioleta (UV) a 260 nm y por tinción de las proteínas virales con azul *Coomasie* en geles desnaturalizantes al 10% de poliacrilamida.

#### 2.2.5.4. INMUNOPURIFICACIÓN DE VIRIONES

La purificación de viriones por inmunocaptura se realizó sobre las muestras recuperadas de un colchón de sacarosa al 15% (p/v), como se describe en el apartado 2.2.5.1.

Se fijaron 5  $\mu$ g de proteína A (Amershan Pharmacia Biotech), resuspendida en 100  $\mu$ l de PBS, sobre cada pocillo de placas de ELISA (NUNC), incubándose a 4°C durante toda la noche. El exceso de proteína A se retiró y se bloquearon las regiones del pocillo que no

hubieran unido proteína A con albúmina de suero bovino o BSA (Sigma) al 5% en PBS mediante incubación durante 1 hora a 37°C. Posteriormente, se unió a la proteína A anticuerpo de conejo anti-ratón (Cappel) por incubación durante 1 hora a 37°C. El exceso de anticuerpo se lavó con PBS-BSA al 0.1% y se añadió anticuerpo monoclonal específico de la proteína M del TGEV, procedente del sobrenadante del hibridoma de ratón 25.22, descrito previamente (Laude y col., 1986). Después de incubar a 37°C durante 1 hora, los pocillos se lavaron con PBS-BSA al 0.1% y se añadió el virus parcialmente purificado en un volumen de 100  $\mu$ l. La unión antígeno-anticuerpo se desarrolló durante una hora a 37°C. Los pocillos se lavaron 10 veces con PBS-BSA al 0.1% y los virus inmunocapturados se recogieron con 350  $\mu$ l de tampón de lisis para extraer el RNA, como se detalla en el apartado 2.7.2.

## **2.3. BACTERIAS**

### **2.3.1. CEPAS BACTERIANAS**

El clonaje de plásmidos de alto número de copia que contenían la secuencia de los minigenomas, así como de los BACs que incluían los DNAs complementarios (cDNAs) virales infectivos, y de los replicones del virus Sindbis, se realizó en la cepa bacteriana DH10B (Gibco BRL). El genotipo de esta cepa es:  $F^- mcrA \Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC) \phi80dlacZ\Delta M15 \Delta lacX74 deoR recA1 araD139 \Delta(ara leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG$ .

### **2.3.2. CRECIMIENTO DE BACTERIAS**

Las bacterias se crecieron en medio líquido Luria-Bertani o LB (bactotripton 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 10 g/l). Para el aislamiento de colonias se utilizó medio LB sólido (15 g de agar por litro de LB). El medio, líquido o sólido, se suplementó con ampicilina (100  $\mu$ g/ml) para la selección de bacterias transformadas con el plásmido pcDNA3 o el plásmido con el replicón del virus Sindbis, o bien con cloranfenicol (12.5  $\mu$ g/ml), para la selección de bacterias transformadas con los BACs, que expresan el gen de resistencia a este antibiótico.

Las bacterias se crecieron a 37°C, excepto cuando estaban transformadas con BACs. Entonces, se crecieron a 30°C para mejorar la estabilidad del plásmido, como ha sido descrito previamente (Almazán y col., 2000).



### **2.3.3. PREPARACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES PARA ELECTROPORACIÓN**

Para la producción de bacterias DH10B competentes para electroporación, las bacterias procedentes de una colonia aislada en medio sólido, se crecieron a 37°C en 2 l de medio SOB (triptona 20 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 0.5 g/l, KCl 0.18 g/l), hasta alcanzar una densidad óptica de 0.7 a una longitud de onda de 550 nm. Las bacterias se sedimentaron por centrifugación en el rotor GSA de Sorvall a 5000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El sedimento de bacterias se lavó en un volumen de glicerol al 10% igual al del cultivo de partida. En los lavados sucesivos el volumen del glicerol se reducía a la mitad del volumen utilizado en el paso previo. En cada etapa de lavado las bacterias se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 minutos a 4°C en el rotor GSA de Sorvall. Después del último lavado las bacterias se resuspendieron en glicerol al 10% y las alícuotas se congelaron rápidamente para su almacenamiento.

### **2.3.4. TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS POR ELECTROPORACIÓN**

Para la transformación por electroporación se utilizaron 50  $\mu$ l de bacterias DH10B competentes y 2  $\mu$ l de la reacción de ligación o 10 ng de plásmido purificado. La mezcla se incubó durante 2 minutos a 4°C y posteriormente se transfirió a cubetas de electroporación de 0.2 cm (Bio-Rad) donde se transformaron mediante un pulso eléctrico de 2.5 kV, 25  $\mu$ F y 200  $\Omega$  utilizando un electroporador *GenePulser* (Bio-Rad). A continuación se añadieron 950  $\mu$ l de medio LB frío y las bacterias se incubaron en agitación durante 1 hora a 37°C. 200  $\mu$ l de la suspensión de bacterias transformadas se sembraron en placas de Petri con medio LB sólido suplementado con ampicilina, para los plásmidos de alto número de copia, o cloranfenicol, para los BACs, según lo descrito en el apartado 2.3.2.

## **2.4. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE DNA**

### **2.4.1. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)**

Para amplificar DNA por PCR se utilizaron entre 25 y 50 ng de molde por reacción. Para todas las amplificaciones analíticas o para las preparativas de fragmentos de hasta 500 pb se añadieron, en un volumen final de 50  $\mu$ l, los oligonucleótidos específicos (100 nM) (Sigma-Genosys), deoxinucleótidos trifosfato ATP, TTP, GTP y CTP (50 nM) de Roche, MgCl<sub>2</sub> (2 mM), tampón de PCR suministrado por el fabricante y 0.3 U de *AmpliTaq* DNA polimerasa

(Roche). Para reacciones preparativas de insertos de más de 500 pb se utilizó 1U de *Pfu* DNA polimerasa de alta fidelidad (Stratagene). Las reacciones se realizaron en el termociclador 2720 *Thermal Cycle* de Applied Biosystems. La temperatura de hibridación se ajustó según la secuencia del oligonucleótido. El tiempo de elongación se modificó en función del tamaño del fragmento a amplificar y del enzima utilizado (1 min/kb para la *AmpliTaq* y 2 min/kb para la *Pfu*). En todos los casos se utilizaron 25-35 ciclos de amplificación.

#### **2.4.2. ELECTROFORESIS DE DNA DE GELES DE AGAROSA**

Para la separación analítica de fragmentos de DNA se utilizaron geles de agarosa (*D-I Media EEO*, Pronadisa) al 1%, con 1  $\mu$ g/ml de bromuro de etidio (Sigma), en tampón TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM). La electroforesis se realizó a 120 V.

Para electroforesis preparativas se procedió según el protocolo anterior pero utilizándose geles de agarosa al 0.7%.

#### **2.4.3. PURIFICACIÓN DE DNA DE REACCIONES ENZIMÁTICAS**

Para la purificación de DNA en solución procedente de reacciones enzimáticas se utilizó el sistema *GeneClean* (Q-Biogene), según las instrucciones del fabricante.

#### **2.4.4. PURIFICACIÓN DE DNA EN GELES DE AGAROSA**

El DNA, procedente de reacciones de PCR o restricción, se separó en geles de agarosa al 0.7%. La banda que contenía el fragmento de DNA de interés se cortó y se purificó con el sistema *GeneClean*, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

La purificación de fragmentos procedentes de la digestión de cromosomas artificiales bacterianos se realizó con el sistema *Qiaex® II gel extraction kit* (Qiagen).

#### **2.4.5. ENZIMAS DE CLONAJE: RESTRICCIÓN, GENERACIÓN DE EXTREMOS ROMOS, DESFOSFORILACIÓN Y LIGACIÓN DE DNA**

Las enzimas de restricción utilizadas en la manipulación de DNA se adquirieron de New England Biolabs (NEB), Roche y Fermentas. Para la generación de extremos romos se utilizó el fragmento *Klenow* de NEB. La desfosforilación de los extremos de DNA se realizó con la fosfatasa alcalina de gamba (SAP) de USB. En la ligación de DNA se empleó la DNA ligasa del fago T4 (NEB).

Las reacciones de restricción, generación de extremos romos, desfosforilación y ligación, se hicieron según los protocolos previamente descritos (Sambrook y col., 2001).

#### **2.4.6. PLÁSMIDOS DE CLONAJE DE PRODUCTOS DE PCR**

Para el clonaje de productos de PCR amplificados con *AmpliTaq* polimerasa, que genera extremos con una A-protuberante, se utilizó el plásmido *pGEM-T Easy Vector* (Promega), de 3.001 Kb, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El plásmido contiene los promotores de los bacteriófagos T7 y SP6 entre los que se encuentra el sitio de clonaje, que contiene extremos con una T-protuberante.

El clonaje de fragmentos romos de DNA amplificados con *Pfu* polimerasa se realizó en el plásmido *pBlueScript*® II (Fermentas), digerido previamente con la enzima *Eco* RV, que genera extremos romos.

#### **2.4.7. PLÁSMIDOS PARA LA EXPRESIÓN EN CÉLULAS EUCARIOTAS**

Para el clonaje y expresión de minigenomas en células eucariotas se utilizó el plásmido pcDNA3 (Invitrogen) de 5.4 kb. Este vector posee el promotor de los genes inmediatamente tempranos de CMV y un gen de resistencia a ampicilina. El promotor de T7 situado inmediatamente después del promotor de CMV se eliminó por digestión en las dianas *Nde* I y *Bam* HI. En la región 3' de los minigenomas se incluyó una secuencia sintética de poli-A, la ribozima del virus de la hepatitis delta y la señal de terminación de la hormona de crecimiento bovina (BGH), tal y como se había descrito previamente (Izeta y col., 1999).

Los cDNAs virales recombinantes se expresaron bajo el promotor de CMV desde BACs. Se utilizó el plásmido pBeloBAC11 (Wang y col., 1997), cedido al laboratorio por H. Shizuya y M. Simon (*Department of Biology, California Institute of Technology*, Pasadena, California, Estados Unidos). Este plásmido, de 7.5 kb, contiene un gen de resistencia a cloranfenicol (CM<sup>r</sup>), los genes necesarios para mantener una copia única del plásmido por célula (*parA*, *parB*, *parC* y *repE*) y el origen de replicación del factor F de *E. coli* (*oriS*).

El replicón del virus Sindbis está clonado bajo el promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV) en el plásmido pSINrep21 (Agapov y col., 1998) y contiene un gen de resistencia a puomicina. Fue cedido al laboratorio por C. Rice (*The Rockefeller University*, Nueva York, Estados Unidos).

#### **2.4.8. OTROS PLÁSMIDOS**

El plásmido pcDNA3-M33L, utilizado como intermediario de clonaje en la construcción del plásmido pcDNA3-M26, se generó a partir de pSL-M33L, descrito previamente (Izeta y col., 1999), por digestión de este último en los sitios *Nde* I y *Bam* HI e inserción del fragmento resultante en el plásmido pcDNA3, digerido con las mismas enzimas.

El plásmido pcDNA3-M26L se generó a partir de pcDNA3-M33L (Izeta y col., 1999) por PCR solapante, para eliminar la región de 568 nt entre los extremos 5' y 3', utilizando los sitios únicos *Hind* III y *Eco* 72I para introducir el fragmento de PCR. El plásmido pcDNA3-M26L se utilizó como vector para el clonaje de los minigenomas M24, M22, M19, M17 y M15, utilizando su diana única *Kpn* I.

El plásmido pcDNA3-M33GUS se generó a partir del plásmido pSL-M39GUS (Alonso y col., 2002), por eliminación de las TRSs virales que precedían al gen de la  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) y de la región interna del minigenoma M39, que está ausente en el genoma defectivo M33, mediante digestión con la enzima *Blp* I y *Nde* I. El plásmido resultante se digirió con *Nde* I y *Bam* HI y se clonó en pcDNA3 para generar el plásmido pcDNA3-M33GUS. A partir de este plásmido se obtuvo pcDNA3-M33GUS $\Delta$ 171, por delección de 171 nt del extremo 3' esenciales para la replicación de minigenomas derivados de CoV.

El plásmido pcDNA3-eGFP se generó en el laboratorio por introducción de la proteína eGFP en los sitios *Nde* I y *Bam* HI del vector pcDNA3 (D. Escors y L. Enjuanes, resultados no publicados).

El plásmido pSL-Avr II- $\Delta$ 3-*Ppu* MI-ORF5-LIMP II, generado en el laboratorio (S. Alonso y L. Enjuanes, resultados no publicados), se utilizó como intermediario de clonaje para la generación de los cDNAs virales recombinantes TGEV-PUR46-S<sub>PTV</sub>, que contienen la proteína S del aislado respiratorio PTV.

El plásmido pBeloBAC-PUR-S<sub>PTV</sub>, que contiene el cDNA infectivo del virus recombinante TGEV con el gen S del aislado PTV, fue generado en el laboratorio (C. Sánchez y L. Enjuanes, resultados no publicados).

El plásmido pSINrep21-GFP fue cedido al laboratorio por C. Rice (*The Rockefeller University*, Nueva York, Estados Unidos).

#### **2.4.9. PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS**

Los plásmidos, crecidos en bacterias en presencia de los antibióticos de selección adecuados, se purificaron utilizando los sistemas (i) *Plasmid Mini Kit* (Qiagen), para la preparación de DNA a partir de volúmenes pequeños de cultivo (1-2 ml) o (ii) *Plasmid Midi Kit* (Qiagen), para la preparación de DNA a partir de volúmenes mayores (50-100 ml), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los BACs se purificaron con el sistema *Large-Construct Kit* (Qiagen) a partir de 500 ml de cultivo bacteriano.

El DNA de los plásmidos purificados se secuenció en un secuenciador multicapilar ABI Prism 3730 (Applied Biosystems) para confirmar la introducción correcta del inserto y descartar mutaciones u otras anomalías.

## **2.5. CLONAJE DEL cDNA DE MINIGENOMAS SINTÉTICOS DERIVADOS DEL VIRUS TGEV EN PLÁSMIDOS DE EXPRESIÓN DE CÉLULAS EUCARIOTAS**

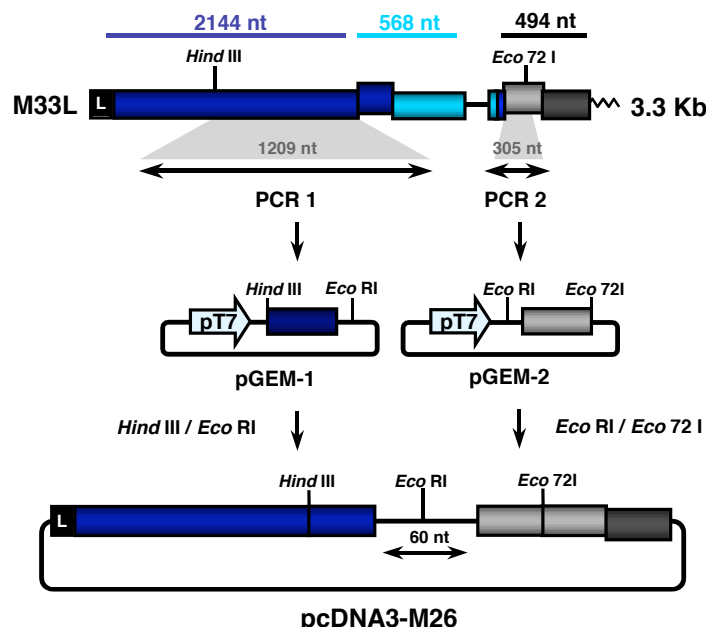
### **2.5.1. GENERACIÓN DEL cDNA DEL MINIGENOMA M26**

Para obtener el cDNA del minigenoma M26, se amplificaron por PCR los fragmentos denominados 1 y 2, con las parejas de oligonucleótidos 5'-**AAGCTTTATGATATCTTCG** G-3' / 5'-TTCAAATGATGAACC-3' y 5'- **ATGCTGTATTTATTACAG**-3' / 5'-**CACGT** GCTTACCATTC-3', respectivamente, utilizando como molde el plásmido pSL-M33L (Izeta y col., 1999). Se representa en negrita la diana *Hind* III (en la primera pareja de oligonucleótidos) y *Eco* 72I (en la segunda pareja). Ambos productos de PCR se clonaron en el sistema *pGEM-T Easy Vector*. El plásmido pGEM-1, que contenía el fragmento 1 de PCR, se digirió con las enzimas *Eco* RI y *Hind* III y el plásmido pGEM-2, que contenía el fragmento 2 de PCR, se cortó en las dianas *Eco* RI y *Eco* 72I. Los fragmentos obtenidos se ligaron al vector pcDNA3-M33L previamente digerido con las enzimas *Hind* III y *Eco* 72I para dar lugar a pcDNA3-M26 (Fig. 7). Este plásmido contiene las secuencias de los extremos 5' y 3' del minigenoma M26 separadas por una región espaciadora de 60 nt, derivada del plásmido intermedio de clonaje (pGEM-T), y una diana única *Sbf* I.

### **2.5.2. GENERACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS QUE CONTIENEN EL cDNA DE LOS MINIGENOMAS M24, M22, M19, M17, M15 Y MA1**

## materiales y métodos

Los minigenomas mutantes de delección en la región 5' del minigenoma M26 (M24, M22, M19 y M17) se generaron por amplificación de un fragmento de PCR con el oligonucleótido directo 5'-**AAGCTTTATGATATCTTCGG**-3' (diana *Hind* III en negrita)

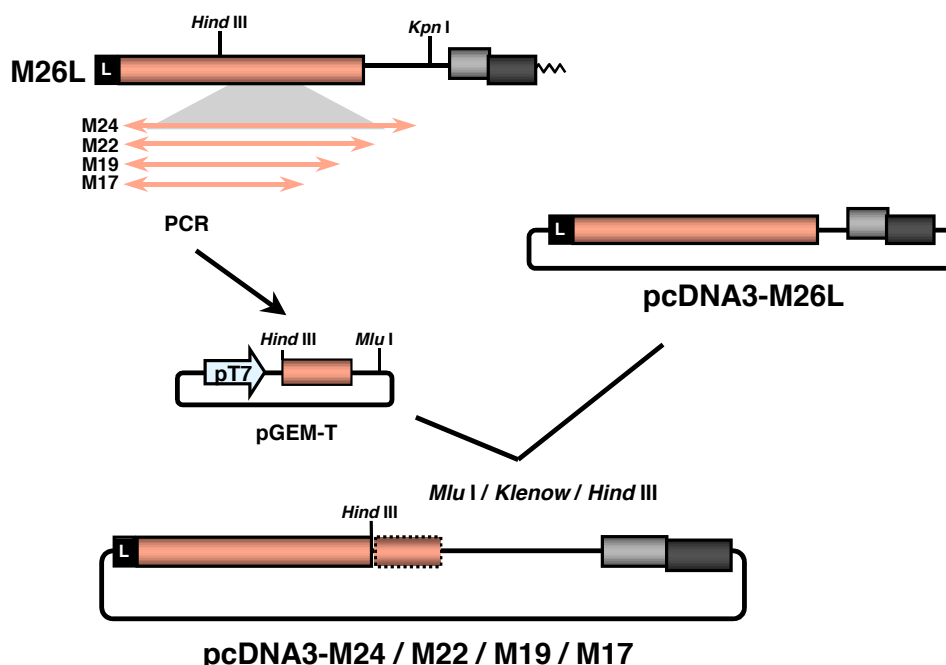


**Figura 7. Esquema del clonaje del cDNA del minigenoma M26 en el vector pcDNA3.** Se amplificaron por PCR los fragmentos 5' (PCR 1) y 3' (PCR 2) del genoma del TGEV contenidos en el minigenoma M33L, flanqueados por las dianas de restricción *Hind* III y *Eco* 72I, respectivamente. Ambos productos de PCR se clonaron en plásmidos pGEM-T. La digestión con las enzimas indicadas generó dos fragmentos que se introdujeron en el vector pcDNA3-M33L, entre los sitios de restricción *Hind* III y *Eco* 72I. La secuencia espaciadora de 60 nt que une los extremos 5' y 3' del minigenoma M26 proviene del plásmido intermedio de clonaje (pGEM-T) y contiene una diana única *Sbf* I y la diana *Eco* RI. L, secuencia líder. pT7, promotor del bacteriófago T7.

y los distintos oligonucleótidos reversos descritos en la Tabla 2 a partir del plásmido pcDNA3-M26L. Los fragmentos obtenidos se clonaron en *pGEM-T Easy Vector* y se digirieron con la enzima *Mlu* I. Posteriormente, se generaron extremos romos con el fragmento *Klenow* y se realizó una nueva digestión con la enzima *Hind* III. Cada uno de los fragmentos obtenidos se ligó al vector pcDNA3-M26L cortado previamente con *Kpn* I, romizado con el fragmento *Klenow* y digerido nuevamente con *Hind* III, para dar lugar a los plásmidos pcDNA3-M24, pcDNA3-M22, pcDNA3-M19 y pcDNA3-M17 (Fig. 8).

**Tabla 2.** Oligonucleótidos reversos utilizados para el clonaje de los minigenomas M24, M22, M19 y M17.

Minigenoma	Polaridad	Oligonucleótido (5'-3')
M24	Negativa	GGTGTACACATTAACAGTTGCACCAACCAAGC
M22	Negativa	CCGTCGACACGATTGTCTGGAACCACAAATGTTGGC
M19	Negativa	ACGCGTCTCTTTTAACGCTGCATGC
M17	Negativa	ACGCGTCTCTTTTAACGCTGCATGC



**Figura 8.** Esquema del clonaje del cDNA de los minigenomas M24, M22, M19 Y M17. Se amplificaron por PCR fragmentos de distintos tamaños de la región 5' del minigenoma M26. El oligonucleótido de polaridad positiva, que contiene la diana *Hind* III, hibrida en los nt 936 a 955 del minigenoma M26. Los oligonucleótidos de polaridad negativa se indican en la Tabla 2. Los productos obtenidos se clonaron en el vector pGEM-T. Estos plásmidos se digirieron con la enzima *Mlu* I, se generaron extremos romos con el fragmento *Klenow* y se cortaron con *Hind* III. Los insertos así obtenidos se ligaron en el vector pcDNA3-M26L, cortado con la enzima *Kpn* I, romizado, y digerido a continuación con *Hind* III. Los minigenomas generados poseen una secuencia espaciadora de 60 nt, similar a la de la construcción pcDNA-M26, con una diana única *Sbf*. I. pT7, promotor del bacteriófago T7.

El plásmido pcDNA3-M15, que contiene el cDNA del minigenoma M15, se obtuvo por digestión del plásmido pcDNA3-M26L con *Hind* III y *Kpn* I, generación de extremos romos con el fragmento *Klenow*, introducción de la secuencia espaciadora derivada de pcDNA3-M26 (digerida con *Spe* I y *Mlu* I y romizada) y religación del vector así obtenido.

El plásmido pcDNA3-MA1, que contiene el cDNA del minigenoma MA1, se obtuvo por digestión del plásmido pcDNA3-M26L en el sitio *Kpn* I, generación de extremos romos con el fragmento *Klenow*, nueva digestión con *Psh* AI, introducción de la secuencia espaciadora derivada de pcDNA3-M26 (digerida con *Spe* I y *Mlu* I y romizada) y religación del vector así obtenido.

#### 2.5.2.1. INTRODUCCIÓN DE LAS REGIONES FA Y FB EN LOS MINIGENOMAS

##### M22, M19 Y M17

Los fragmentos FA (nt 1745 a 2144 en el genoma del TGEV) y FB (nt 1599 a 2144) se generaron por PCR, a partir del plásmido pcDNA3-M26, con las parejas de oligonucleótidos 5'-GGGTCGACGCTTTTACGATTGTAAACTACAAGCC-3' / 5'-**CAC GTGCTTACCATTC**-3' y 5'-CTTTGTGCTTGGTGCTAAATACCTGTTG-3' / 5'-**CAC GTGCTTACCATTC**-3', respectivamente. En negrita se indica la diana *Eco* 72I de los oligonucleótidos. Los productos obtenidos se clonaron en *pGEM-T Easy Vector*. Posteriormente, se digirieron los plásmidos en la diana *Sac* II, situada en el vector, se romizaron con el fragmento *Klenow* y se cortaron de nuevo con la enzima *Eco* 72I. Los insertos FA o FB se ligaron a un nuevo inserto (correspondiente a la región 3' del extremo 5' de cada miniegnoma) preparado por digestión de los plásmidos pcDNA3-M22, M19 ó M17 con la enzima *Pst* I, romización con el fragmento *Klenow* y una nueva digestión en la diana *Hind* III. La ligación doble anterior se introdujo en el vector preparado a partir del plásmido pcDNA3-M26, por restricción con *Hind* III y *Eco* 72I, para dar lugar a los plásmidos pcDNA-M22FA, pcDNA-M19FA, pcDNA-M19FB, pcDNA-M17FA y pcDNA-M17FB.

#### 2.5.2.2. INTRODUCCIÓN DE LAS REGIONES Fc Y Fd EN EL MINIGENOMA MA1

Los fragmentos Fc (nt 936 a 1149 del genoma viral) y Fd (nt 936 a 1362) se generaron por PCR, a partir del plásmido pcDNA3-M26, y las parejas de oligonucleótidos 5'-AAGC TTTATGATATCTTCGG-3' / 5'-CCGTCGACCATCACCAAGGCTTAATATCACCC-3' y 5'-AAGCTTTATGATATCTTCGG-3' / 5'-CTCTTTTAACGCTGCATGC-3',



respectivamente. Los productos de PCR se ligaron al vector pcDNA3-MA1 digerido con *Sbf* I y tratado con el fragmento *Klenow* para la generación de extremos romos. Los plásmidos resultantes se nombraron pcDNA3-MA1Fc y pcDNA3-MA1Fd.

#### 2.5.2.3. INTRODUCCIÓN DEL GEN DE LA $\beta$ -GLUCURONIDASA EN LOS MINIGENOMAS M15 Y MA1

El gen GUS se amplificó con los oligonucleótidos 5'-**CCTGCAGGATGGTCCGTCCTGTAG**-3' / 5'-**CCTGCAGGTCATTGTTTGCCTCCC**-3', que incluían la diana para la enzima *Sbf* I (nucleótidos en negrita), a partir del plásmido pcDNA3-M33GUS, descrito en el apartado 2.4.8. El fragmento de PCR se digirió con *Sbf* I y se ligó al vector obtenido de la digestión del plásmido pcDNA3-M15 con la misma enzima, para generar el plásmido pcDNA3-M15GUS.

El plásmido pcDNA3-MA1GUS se construyó por digestión del plásmido pSL-mRNA-A1 (descrito en el apartado 2.5.4.) con las enzimas *Nde* I y *Bam* HI. El inserto resultante se clonó en los sitios correspondientes de pcDNA3.

#### 2.5.3. GENERACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS QUE CONTIENEN EL cDNA DE MINIGENOMAS EN LOS QUE SE HAN ELIMINADO ESTRUCTURAS SECUNDARIAS PREVISTAS POR EL PROGRAMA mFOLD

La delección de estructuras secundarias previstas por el algoritmo mFOLD (Zuker, 2003) en los nt 1-950 del minigenoma M26 (SL1-8) se realizó por mutagénesis dirigida con el sistema *Quick Change Mutagenesis Kit* de Stratagene, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los oligonucleótidos utilizados se describen en la Tabla 3. El tiempo de elongación durante la reacción de PCR inversa fue de 8 minutos y 30 segundos. Los plásmidos resultantes de la PCR se digirieron con la enzima *Dpn* I para eliminar el DNA molde metilado y se transformaron en las bacterias.

La delección de motivos de estructura secundaria previstos por el programa mFOLD entre los nt 951 a 2144 del minigenoma M26 (SL9-17) se realizó por PCR solapante. Para amplificar el primer fragmento de PCR se utilizó el oligonucleótido directo (OD) 5'-**AAGCTTTATGATATCTTCGG**-3' (sitio *Hind* III en negrita) y cada uno de los oligonucleótidos reversos indicados en la Tabla 4. Para obtener el segundo fragmento de PCR se utilizaron los oligonucleótidos directos de la Tabla 4 y el oligonucleótido reverso (OR) 5'-**CACGTGCTTACCATTC**-3' (diana *Eco* 72I en negrita). Los fragmentos primero

y segundo de PCR se utilizaron como molde en una PCR solapante con los oligonucleótidos OD y OR. De esta forma, se obtuvieron productos de PCR flanqueados por los sitios *Hind* III y *Eco* 72I, que incluyen las delecciones de las estructuras secundarias SL9 a SL17. Los fragmentos amplificados se cortaron con las enzimas *Hind* III y *Eco* 72I y se clonaron en el vector pcDNA3-M26 digerido con las mismas enzimas. La posición de los nucleótidos deleccionados se muestra en la Tabla 5.

#### 2.5.4. GENERACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS QUE TRANSCRIBEN DESDE EL MINIGENOMA M39 LAS SECUENCIAS QUE POTENCIALMENTE CONTIENEN LA SEÑAL DE ENCAPSIDACIÓN

Los fragmentos en los que se subdividió el minigenoma M33 (A1 a A4 y B) se amplificaron por PCR con los oligonucleótidos de la Tabla 6, que flanqueaban cada una

**Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en la generación de los minigenomas SL1-8 por mutagénesis dirigida.**

Minigenoma	Polaridad	Oligonucleótido (5'-3')
SL1	Positiva	GAGCGAACGGTGCAGTTCGCCCGTAC
	Negativa	GTACGGGCGGAAGTGCACCGTTCGCTC
SL2	Positiva	CCCGTACAACGTTTCGCCGGCCGCC
	Negativa	GGCGGCCGCGCAAACGTTGTACGGG
SL3	Positiva	CGTGCCTAGTCTTCCTTTGAGGGCTATG
	Negativa	CATAGCCCTCAAAGGAAGACTAGGCACG
SL4	Positiva	CGTACCAGAATACTGTTCTTGGTAACGG
	Negativa	CCGTTACCAAGAACAGTATTCTGGTACG
SL5	Positiva	CCTGTTCTTCTTACCGAACACTTTGACCTTAAATTGC
	Negativa	GCAATTTTAAGGTCAAAGTGTTTCGGTAAGAAGAACAGG
SL6	Positiva	GAAGGAGAGGAGTACAGAAACCGCTGAATCAGC
	Negativa	GCTGATTCAGCGGTTTCTGTACTCCTCTCCTTC
SL7	Positiva	GCGCGATGAGAAACCAAACCTCTCTTTACC
	Negativa	GGTAAAGAGAGTTTGGTTTCTCATCGCGC
SL8	Positiva	CATAAATTGCCAACTCACCAGTCAAAAAGAACTC
	Negativa	GAGTTCTTTTGGTGGTGGTGGTGGCAATTTATG

de las regiones, introduciendo secuencias de restricción *Sal* I en los extremos (en los oligonucleótidos la secuencia *Sal* I está indicada en negrita). Los fragmentos amplificados se digirieron con la enzima *Sal* I y se clonaron en el plásmido pSL-M39-GUS (Alonso y col., 2002) cortado con la misma enzima.

**Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en la generación de los minigenomas SL9-17 por PCR solapante.**

<b>Minigenoma</b>	<b>Polaridad</b>	<b>Oligonucleótido (5'-3') (a)</b>
SL9	Positiva	<i>CACCCTTTATGG</i> ATCGCTGCTACTCTTAGATGCCC
	Negativa	CCATAAAGGGTG ATCCGAAGATATC
SL10	Positiva	<i>CTTCATTTTAT</i> TTGGAGATTGGACTGG
	Negativa	ATAAAATGAAG AGTGTCAAAGC
SL11	Positiva	<i>GTCACTAGTATG</i> TTCAATATGCTGGTGATG
	Negativa	CATACTAGTGAC AACAGCATCACC
SL12	Positiva	<i>GCTGGTGATGTT</i> TGTATGCACCCCTGGTTTTG
	Negativa	AACATCACCAGC ATATTGAAG
SL13	Positiva	<i>CATTACAGGAAAA</i> GAAGACTCCATGGTTTG
	Negativa	TTTCCTGTAATG ATACAATC
SL14	Positiva	<i>GCACTTCTGCTTTT</i> TAAAGATCTTGTAGACAAG
	Negativa	AAAAGCAGAAGTGC AAAGTG
SL15	Positiva	<i>CAGATTATCACA</i> TCAATAATGCACTTGTCAAAC
	Negativa	TGTGATAATCTG CGTAAAAAC
SL16	Positiva	<i>GTAGCACCAGG</i> ACAAGAGTGGTGAATATTATTC
	Negativa	CCTGGTGCTAC AACATCATC
SL17	Positiva	<i>TATGATGTTGAT</i> TGAAAATCACTAGTGAATTCG
	Negativa	ATCAACATCATA AACGATGTC

(a) Los nucleótidos solapantes se representan en cursiva.

**Tabla 5. Número de nucleótidos eliminados y posición de la delección en los minigenomas SL1-17.**

Minigenoma	Nº de nucleótidos delecionados	Posición de la delección en el genoma defectivo M26
SL1	48	198-246
SL2	31	265-296
SL3	46	380-426
SL4	47	455-502
SL5	57	552-609
SL6	46	637-682
SL7	11	793-804
SL8	21	867-888
SL9	44	970-1013
SL10	44	1016-1059
SL11	40	1167-1206
SL12	50	1226-1276
SL13	47	1419-1465
SL14	47	1604-1650
SL15	52	1722-1773
SL16	38	1949-1986
SL17	44	2097-2140

**Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados en la construcción de los plásmidos pSL-M39-Ai/B.**

Región	Oligonucleótido positivo (5'-3') (a)	Oligonucleótido negativo (5'-3') (a)
A1	<b>GTCGACGAAATATTTGTCTTTCTATGAAATC</b>	<b>GTCGACATGGCACCTCTGACAGTGCGAGC</b>
A2	<b>GTCGACCGTTCTTGAGGACTTTGACCTTAAAATTG</b>	<b>GTCGACCATCACCAGGCTTAATATCACCC</b>
A3	<b>GTCGACTTTCTGGCAAAGTTAAGGGTGTC</b>	<b>GTCGACACGATTGTCTGGAACCAAAATGTTGGC</b>
A4	<b>GTCGACGCTTTTACGATTGTAACTACAAGCC</b>	<b>GTCGACTTCAAATGATGAACCAAGTTTTGC</b>
B	<b>GTCGACCAAATACCAACTGGCACACAAGATCC</b>	<b>GTCGACAATTCTTCAGTGCAAGCACCTACTGTC</b>

(a) En negrita se indica la diana *Sal* I.

## 2.6. OBTENCIÓN DE cDNAs DE VIRUS TGEV Y DEL REPLICÓN DEL ALFAVIRUS SINDBIS, QUE EXPRESAN RNAs POTENCIALMENTE RESPONSABLES DE LA ENCAPSIDACIÓN

### 2.6.1. GENERACIÓN DE cDNAs DE VIRUS RECOMBINANTES EN PLÁSMIDOS pBACs, QUE INCLUYEN EN LA POSICIÓN DE LOS GENES 3a/b SECUENCIAS SOLAPANTES DEL EXTREMO 5' DEL TGEV

El extremo 5' del minigenoma M26 sin la secuencia líder (nt 100 a 2144) se dividió en 9 fragmentos de aproximadamente 400 nt (R1.1 a R6) solapando unos 100 nt entre si. Cada uno de estos fragmentos se introdujo en la posición de los genes no esenciales 3a/b mediante PCRs solapantes. De esta forma, el virus transcribe desde las TRSs del gen 3a un

RNA mensajero subgenómico que incluye distintas secuencias del extremo 5' del minigenoma M26 precedidas de la región líder. Como control negativo se introdujo, en la misma posición, un fragmento de 400 nt del extremo 3' del gen de GFP (3'GFP).

La primera PCR (i) amplificó un fragmento 3' del gen S (nt 24153 a 24883 del genoma de TGEV) y la región de la TRS del gen 3a y a partir del plásmido pBeloBAC-PUR-S<sub>PTV</sub>, utilizando los oligonucleótidos 5'-TTTGACCCCCAGAACTA-3' / 5'-ATCAAGTTCGTCA

**Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados en la generación de los pBACs que incluyen fragmentos del extremo 5' del minigenoma M26 en el sitio de los genes 3a/b del TGEV.**

Fragmento	Polaridad	Oligonucleótido (5'-3') (a) (b)	Posición en el genoma
R1.1	Positiva	GACGAACTTGAT GAAATATTTGTCTTTCTATG	
	Negativa	GAACCGCACTCGCTACTACTAGGCG	100-242 nt
R1	Positiva	GACGAACTTGAT GAAATATTTGTCTTTCTATG	
	Negativa	CGGGCCGCTAAGCCCATTGCAGTTAGCTCTAAC	100-598 nt
R2	Positiva	GACGAACTTGAT TTGGTGTCTTGGTAACGGAG	
	Negativa	CGGGCCGCTAAGCTTGACTGGTGGTGCTACATG	499-898 nt
R3.1	Positiva	GACGAACTTGAT TATATGTTGATCAATACATG	
	Negativa	GGGCCCCGCTTAGCTCAGAACCACACGGGCATC	649-1048 nt
R3	Positiva	GACGAACTTGAT ATCAGCAAACCTCTCTTACCATTG	
	Negativa	CGGGCCGCTAAGCTTGGCAAAGAACTTAACTCC	799-1198 nt
R3.2	Positiva	GACGAACTTGAT TCTTCGGATCACCCTTTATG	
	Negativa	GGGCCCCGCTTAGCGCATGCAACTAGTGATTGTC	949-1348 nt
R4	Positiva	GACGAACTTGAT TTCTGGCAAAGTTAAGGGTG	
	Negativa	CGGGCCGCTAAGCTGCACCACACTTTTGTACAAAC	1099-1498 nt
R5	Positiva	GACGAACTTGAT ATTGTATCATTACAGGAAAATTG	
	Negativa	CGGGCCGCTAAGCACAAGTTTGACAAGTGCATTATT	1399-1798 nt
R6	Positiva	GACGAACTTGAT ATGTTTTTACGCAGATTATC	
	Negativa	CGGGCCGCTAAGCTTCAAATGATGAACCAAGTTTGTG	1699-2144 nt
3'GFP	Positiva	GACGAACTTGAT ACAAGACCCGCGCCGAGGTG	
	Negativa	CGGGCCGCTAAGCTTACTTGTACAGCTCGTCCATG	No hibrida en el genoma

## materiales y métodos

(a) La diana *Blp* I, incluida en los oligonucleótidos de polaridad negativa, se representa en negrita.

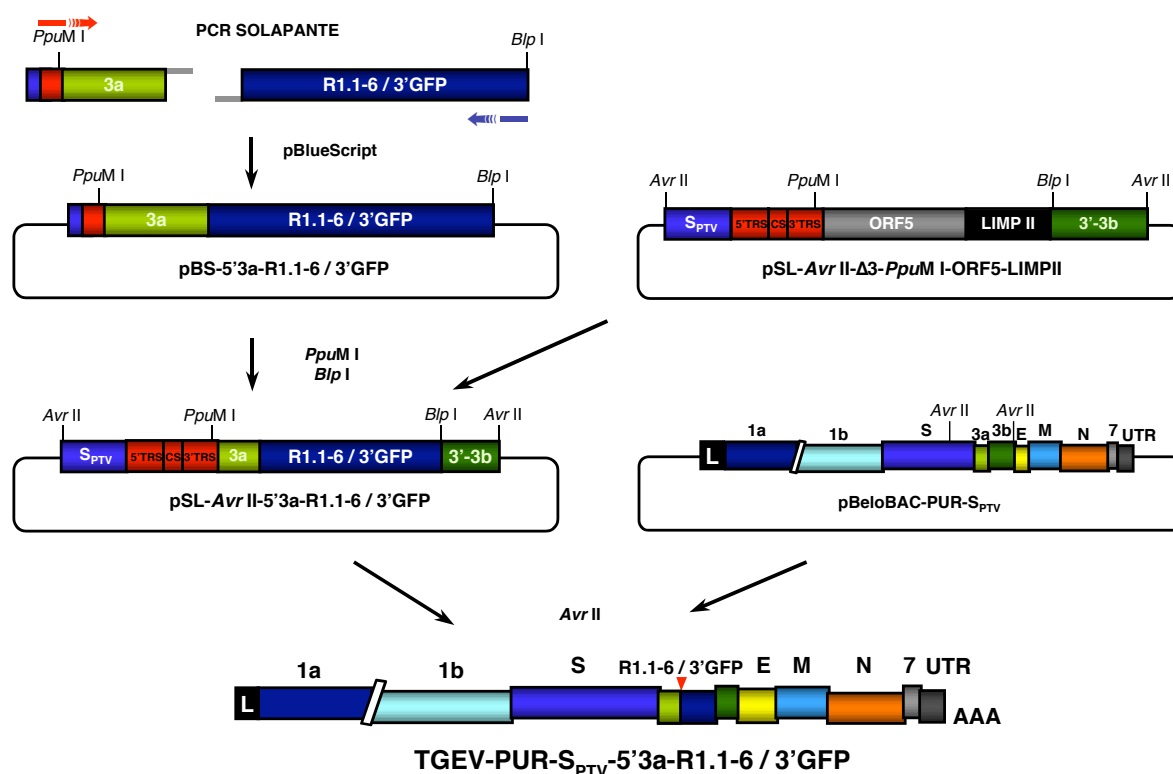
(b) Los nucleótidos en cursiva solapan con el extremo 3' del primer fragmento de PCR que incluye las TRSs.

AGTACA GCATCTAC-3' (los nt en cursiva hibridan con el oligo directo de la segunda PCR). Esta secuencia amplificada incluye la diana *Ppu* MI (en la región 3'TRS del gen 3a) utilizada en el clonaje. La segunda PCR (ii) amplificó las secuencias específicas de los fragmentos R1.1 a R6 y 3'GFP con los oligonucleótidos de la Tabla 7, a partir de los plásmidos pcDNA3-M26 y pcDNA3-GFP, respectivamente. Al fragmento R1.1, generado con los oligonucleótidos descritos en la Tabla 7, se unió, mediante PCR solapante, 250 nt del extremo 3' de GFP con los oligonucleótidos 5'-CGAGTGCGGTTCGCAGAAGAACGGC ATCAAGG-3' y 5'-CGGGCCGCT**AAGCTT**ACTTGTACAGCTCGTCCATG-3' (la diana *Blp* I está indicada en negrita), para completar un fragmento de unos 400 nt.

Utilizando como molde los productos de PCR descritos (i y ii) se realizó una PCR solapante, con el oligonucleótido sentido de la primera PCR y los oligonucleótidos reversos de la segunda PCR (Tabla 7). Para la PCR solapante del fragmento R1.1 se utilizó el oligonucleótido reverso de la amplificación de 250 nt de GFP, descrito anteriormente. El producto final se clonó en el vector pBlueScript digerido con Eco RV para obtener pBS-5'3a-R1.1-6/3'GFP. Los plásmidos pBlueScript con las secuencias del extremo 5' del minigenoma M26 se digirieron con las enzimas de restricción *Ppu* MI y *Blp* I y el inserto obtenido se ligó al vector pSL-Avr II-Δ3-*Ppu* MI-ORF5-LIMP II (descrito en el apartado 2.4.8.), digerido previamente en los mismos sitios. Se obtuvieron los plásmidos pSL-Avr II-5'3a-R1.1-6/3'GFP, que se cortaron con la enzima *Avr* II y, el producto de esta nueva digestión, se ligó al vector pBAC proveniente de la digestión del plásmido pBeloBAC-PUR-S<sub>PTV</sub> con la misma enzima, para dar lugar a los plásmidos pBAC-PUR-S<sub>PTV</sub>-5'3a-R1.1-6/3'GFP, que incluyen el cDNA del genoma del TGEV en el que los genes 3a/b se han sustituido por las secuencias del extremo 5' del minigenoma M26 (Fig. 9).

La obtención de los plásmidos pBAC-PUR-S<sub>PTV</sub>-Δ5'3a-R1.1 y pBAC-PUR-S<sub>PTV</sub>-Δ5'3a-R1, en los que se eliminó la secuencia 5'3a (3'TRS y región 5' del comienzo del gen 3a), se realizó también por PCR solapante. La primera PCR amplificó la secuencia 5'TRS del gen 3a con los oligonucleótidos 5'-TTTGACCCCCAGAACTA-3' / 5'-GTTTAGTTCTTAAAG ACTTTATTCATCATCC-3' (nt 24153 a 24803 del genoma de TGEV) a partir del

plásmido pBeloBAC-PUR-S<sub>PTV</sub>. La segunda PCR amplificó las secuencias de R1.1 y R1 partir del plásmido pcDNA3-M26, el oligo directo 5'-*GTCTTTAAGAACTAAACGAAAT* ATTTGTCTTTCTATGAAATC-3' (en cursiva se indican los nucleótidos complementarios para la PCR solapante) y los correspondientes oligonucleótidos antisentido indicados en la



**Figura 9. Esquema del clonaje de los fragmentos del extremo 5' del minigenoma M26 en el cDNA del virus TGEV-PUR-S<sub>PTV</sub>.** Los fragmentos R1.1-6 / 3'GFP, que incluyen las secuencias 3' TRS del gen 3a (CS, 3' TRS y 57 nt del extremo 5' del gen 3a), unidas a regiones del extremo 5' del minigenoma M26, flanqueados por los sitios *PpuMI* y *BlnI*, se amplificaron por PCR solapante. Los productos de PCR se clonaron en el plásmido pBlueScript y después de digerir con las enzimas *PpuMI* y *BlnI*, el inserto se introdujo en un plásmido intermedio pSL, desde donde un nuevo inserto resultante de la digestión con *AvrII*, se introdujo en los correspondientes sitios *AvrII* de pBeloBAC-PUR-S<sub>PTV</sub> para dar lugar al cDNA de TGEV que incluye, en el sitio de los genes 3a/b y bajo las TRSs del gen 3a, secuencias procedentes del minigenoma M26.

Tabla 7 para R1.1 y R1. El fragmento Δ5'3aR1.1 también se fusionó a 250 nt del extremo 3' de GFP para completar un fragmento de unos 400 nt, como se describe anteriormente.

## 2.6.2. GENERACIÓN DE REPLICONES DEL ALFAVIRUS SINDBIS QUE EXPRESAN RNAs DEL EXTREMO 5' DEL TGEV

Los fragmentos  $\Delta$ L- $\Delta$ 5'3a-R1.1, L- $\Delta$ 5'3a-R1.1 y L-5'3a-R4 se generaron con los oligonucleótidos de la Tabla 8, que añadían las dianas de restricción *Xba* I y *Mlu* I en los extremos 5' y 3' respectivamente, utilizando como molde el cDNA sintetizado por RT a partir de sgRNAs de células infectadas con los virus TGEV-PUR-S<sub>PTV</sub>- $\Delta$ 5'3a-R1.1, ó R4. Los fragmentos de PCR y el plásmido pSINrep21, que contiene el replicón del virus Sindbis, se cortaron con las enzimas *Xba* I y *Mlu* I. Se obtuvieron así el vector y los insertos que se ligaron para generar los plásmidos pSINrep21- $\Delta$ L- $\Delta$ 5'3a-R1.1, pSINrep21-L- $\Delta$ 5'3a-R1.1 y pSINrep21-L- $\Delta$ 5'3a-R4.

**Tabla 8. Parejas de oligonucleótidos utilizados en la generación de los DNAs complementarios a los sgRNAs que se expresan desde el replicón del virus Sindbis.**

sgRNA	Polaridad	Oligonucleótido (5'-3') (a)
<b><math>\Delta</math>L-<math>\Delta</math>5'3a-R1.1</b>	Positiva	CCGGGTCTAGACGTGGCTATATCTCTTCTTTTAC
	Negativa	GGCCC <b>ACGCGT</b> GTCAATTTTCGTTTAGAACCGC
<b>L-<math>\Delta</math>5'3a-R1.1</b>	Positiva	CCGGGTCTAGAACTTTTAAAGTAAAGTGAGTG
	Negativa	GGCCC <b>ACGCGT</b> GTCAATTTTCGTTTAGAACCGC
<b>L-5'3a-R4</b>	Positiva	CCGGGTCTAGAACTTTTAAAGTAAAGTGAGTG
	Negativa	GGCCC <b>ACGCGT</b> GTCAATTTTCGTTTAGAACCGC

(a) Las dianas de restricción *Xba* I, en los oligonucleótidos de polaridad positiva, y *Mlu* I, en los oligonucleótidos de polaridad negativa, se representan en negrita.

## 2.7. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE RNA

La manipulación de muestras de RNA se realizó siempre en condiciones libres de RNAsas, utilizándose guantes, puntas con filtro y agua tratada con dietilpircarbonato (DEPC).

### 2.7.1. EXTRACCIÓN DEL RNA CELULAR



El RNA citoplasmático total se purificó a las 16 hpi a partir de células ST infectadas y/o transfectadas, crecidas en placas de cultivos de 35 mm de diámetro, utilizando el sistema *RNeasy® Mini Kit* (Qiagen) de acuerdo con las especificaciones del proveedor. La concentración y pureza del RNA se midió por absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro ND-1000 (Nanodrop®). Para las reacciones de RT-PCR, los RNAs celulares se diluyeron entre 10 y 100 veces.

### **2.7.2. EXTRACCIÓN DEL RNA VIRAL**

Los RNAs de virus purificados total o parcialmente y resuspendidos en tampón TNE se aislaron utilizando el sistema *RNeasy® Mini Kit* (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La concentración y pureza del RNA se midió en el espectrofotómetro ND-1000 (Nanodrop®). Para las reacciones de RT-PCR los RNAs virales se utilizaron sin diluir.

### **2.7.3. TRANSFERENCIA E HIBRIDACIÓN A MEMBRANAS DE RNA (NORTHERN BLOT). SÍNTESIS DE SONDAS**

Los RNAs se separaron en geles desnaturalizantes al 1% de agarosa-2.2 M de formaldehído y se transfirieron a membranas de *nylon* cargadas positivamente *BrightStar™-Plus* (Ambion). Para la detección de los RNAs se utilizaron dos sondas de DNA, que se obtuvieron por PCR y se marcaron mediante el sistema *BrightStar™ Psoralen-Biotin Nonisotopic Labeling Kit* (Ambion), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para detectar el RNA del minigenoma M26, de tamaño similar al mRNA del gen M, se utilizó una sonda específica de la replicasa del virus PUR46-MAD (nt 936 a 1149). Para detectar los mRNAs transcritos por el virus y el genoma viral, se utilizó una sonda que hibridaba en el extremo 3' del virus (nt 28300 a 28544). Para la detección del replicón del virus Sindbis y de los RNAs subgenómicos transcritos, se diseñó una sonda en el gen de resistencia a puromicina (*pac*), situado en el extremo 3' del genoma del replicón y de todos los RNAs subgenómicos (nt 429 a 678 del gen *pac*). Las sondas se hibridaron con el RNA a 42 °C en presencia del tampón de hibridación *ULTRAhyb™* de Ambion, de acuerdo con las instrucciones del proveedor. La detección de las sondas se realizó con el sistema *BrightStar™ BioDetect™ Kit* (Ambion) según las recomendaciones del fabricante.

### **2.7.4. RT-PCR CUALITATIVA**

## materiales y métodos

La detección del RNA genómico del TGEV, de los mRNAs subgenómicos y de los minigenomas transfectados, se realizó mediante reacciones de transcripción reversa (RT) con 100 ng de RNA total y oligonucleótidos reversos específicos (Tabla 9). Las reacciones se realizaron en un volumen de 20  $\mu$ l a 42 °C durante 1 hora y media con deoxinucleótidos trifosfato (ATP, TTP, GTP, CTP) 0.25 mM, y 0.2 U de la transcriptasa reversa de M-MLV (Ambion) en el tampón de reacción suministrado por el fabricante.

La amplificación de DNA se realizó mediante PCR utilizando como molde 2  $\mu$ l del cDNA de las reacciones de RT y oligonucleótidos específicos (Tabla 9). Las reacciones de

**Tabla 9. Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de RT-PCR cualitativa.**

RNA	Polaridad	Oligonucleótido (5'-3')	Producto amplificado (nt)
<b>Genoma</b>	Positiva	CTTTGTGCTTGCTGCTAAATACCTGTTG	
	Negativa	TAGCCCGTTCAAGAACACC	1328
<b>Minigenoma 1 (a)</b>	Positiva	CTTTGTGCTTGCTGCTAAATACCTGTTG	<b>M26</b> , 765
	Negativa	CACGTGCTTACCATTC	<b>M33</b> , 1333
<b>Minigenoma 2 (a)</b>	Positiva	CGTTCTTGAGGACTTTGACCTTAAAATTG	<b>M26</b> , 1677; <b>M24</b> , 1421; <b>M22</b> , 1183;
	Negativa	AAGTAATAGTCTTTCTAATAATTGGAGTCTACCA	<b>M19</b> , 894; <b>M17</b> , 683
<b>Minigenoma 3 (a)</b>	Positiva	CGTTCTTGAGGACTTTGACCTTAAAATTG	
	Negativa	ATCACTAGATCCAGACGTTAGCTCTTCC	<b>M17</b> , 1057; <b>M15</b> , 847; <b>MA1</b> , 556
<b>M33GUS</b>	Positiva	GCGACCTCGCAAGGC	
	Negativa	CACGTGCTTACCATTC	580
<b>M39GUS</b>	Positiva	CTTGGTGGATCTGTTGCC	
	Negativa	GACCCACACTTTGCCGTAATGAG	1040
<b>mRNA-Ai/B</b>	Positiva	GTGAGTGTAGCGTGGCTATATCTCTTC	
	Negativa	GACCCACACTTTGCCGTAATGAG	948
<b>PUR-S<sub>PTV</sub>-sgRNA (I)</b>	Positiva	GTGAGTGTAGCGTGGCTATATCTCTTC	
	Negativa	ATCACTAGATCCAGACGTTAGCTCTTCC	600-780

(a) Los oligos de RT-PCR están diseñados en regiones 5' y 3' comunes para todos los minigenomas. El tamaño de la banda amplificada por RT-PCR para cada uno de los genomas defectivos varía en función de la secuencia 5' del TGEV incluida en el minigenoma. Junto al nombre del minigenoma se indica el tamaño de banda esperado en cada caso.

(b) El tamaño del amplicón varía entre 600 y 780 nt debido a las diferencias de nt entre los sgRNA, por incorporación o no de la región 5'3a y por el tamaño relativamente variable de los fragmentos del minigenoma M26 introducidos (entre 400 y 500 nt).

PCR se realizaron en 30 ciclos, con una temperatura de hibridación entre 50 y 55 °C (dependiendo del oligonucleótido) durante 30 segundos, y una elongación a 72 °C entre 1 y 2 minutos, dependiendo de la longitud del fragmento amplificado. Los productos de PCR se analizaron en electroforesis en gel de agarosa al 1%.

### **2.7.5. RT-PCR CUANTITATIVA O EN TIEMPO REAL**

La cuantificación relativa del RNA genómico, de los RNAs subgenómicos y de los minigenomas, se realizó mediante RT-PCR en tiempo real. El diseño de los oligonucleótidos específicos para la amplificación se hizo con el programa *Primer Express® v2.0*, según instrucciones del proveedor. Previamente se comprobó que todas las parejas de oligonucleótidos utilizadas para la cuantificación poseían la misma eficiencia de amplificación en la PCR, medida como la pendiente de la recta estándar, de valor  $-3.3$  aproximadamente. La reacción de RT se realizó con 30 ng de RNA total y con el mismo oligonucleótido reverso de la PCR (Tabla 11), a excepción de la cuantificación de los RNAs subgenómicos  $\Delta 5'3a-R1.1$ ,  $\Delta 5'3a-R1$ ,  $\Delta L-\Delta 5'3a-R1.1$  y  $L-\Delta 5'3a-R1.1$ , en los que se utilizó un oligonucleótido (5'-TTTAGAACCGCCTGAGAAAAGG-3') que hibridaba en el extremo 3' del gen 3b (nt 25797 a 25818 del genoma viral) no delecionado para discriminar el producto de PCR del genoma viral, que posee la misma secuencia. Las reacciones se realizaron en un volumen de 20  $\mu$ l a 50 °C durante 1 hora y media con deoxinucleótidos trifosfato (ATP, TTP, GTP, CTP) 0.25 mM, y 5 U de la enzima *ThermoScript Reverse Transcriptase* (Invitrogen) en el tampón de reacción suministrado por el fabricante.

Para la PCR se utilizaron 2  $\mu$ l del cDNA generado en la RT, con los oligonucleótidos indicados en la Tabla 11 a las concentraciones determinadas para que la PCR fuera eficiente, en 25  $\mu$ l de reacción con el reactivo *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), según instrucciones del proveedor. Para cada reacción se realizaron triplicados de la medición. La detección se realizó con *ABI PRISM 7000 sequence detection system* (Applied Biosystems). Los resultados se analizaron con el programa *ABI PRISM7000 SDS v1.0* (Applied Biosystems). La cantidad relativa de cada especie de RNA se cuantificó respecto al genoma viral (calibrador), utilizando el método  $\Delta\Delta C_t$ , o respecto a

**Tabla 11. Oligonucleótidos utilizados para las reacciones de RT-PCR en tiempo real.**

RNA	Polaridad	Oligonucleótido (5'-3')
<b>Genoma</b>	Positiva	TTCTTTTGACAAAACATACGGTGAA
	Negativa	CTAGGCAACTGGTTTGTAACATCTTT
<b>Minigenoma</b>	Positiva	CCATATGGGAGAGCTCCCAA
	Negativa	TCTGGTTTCTGCTAAACTCCTATATAAGATATT
<b>mRNA-N</b>	Positiva	CGTGGCTATATCTCTTCTTTTACTTTAACTAG
	Negativa	CCTGGTTGGCCATTTAGAAGTTTAG
<b>mRNA-7</b>	Positiva	CGTGGCTATATCTCTTCTTTTACTTTAACTAG
	Negativa	AAAAGTGTAAATAAATACAGCATGGAGGAA
<b>mRNA-3a</b>	Positiva	CGGACACCAACTCGAACTAACTTAC
	Negativa	ATCAAGTTCGTCAAGTACAGCATCTAC
<b>sgRNA-Δ5'3a</b>	Positiva	CGTGGCTATATCTCTTCTTTTACTTTAACTAG
	Negativa	GTGATTGCCAAACTGAATGGAA
<b>GFP</b>	Positiva	GAGTACAACTACAACAGCCACAA
	Negativa	CGATGGGGGTGTTCTGCTG
<b>β-actina</b>	Positiva	ATGTTTGAGACCTTCAACACGCC
	Negativa	CAGAGTCCATGACAATGCCAGTGGT

una recta patrón generada por diluciones seriadas de orden 10 de cada amplicón analizado, según recomendaciones del proveedor.

#### 2.7.5.1. CÁLCULO DE LA EFICIENCIA DE ENCAPSIDACIÓN DE RNAs

La cantidad relativa de cada especie de RNA se cuantificó por RT-PCR en tiempo real, tal y como se ha descrito en el apartado anterior. La eficiencia de encapsidación de un RNA determinado se expresó en porcentaje respecto a la encapsidación del RNA genómico (gRNA), al que arbitrariamente se le asignó una eficiencia de encapsidación del 100%, mediante la fórmula de la Fig. 10.

#### 2.7.6. TRATAMIENTO CON DNAsa DEL RNA

3  $\mu\text{g}$  de RNA total de pase P0 de células transfectadas con el DNA que expresaba los minigenomas, obtenido según se ha descrito en el apartado 2.7.1., se resuspendieron en un volumen final de 45  $\mu\text{l}$  de agua DEPC. La digestión del DNA se realizó con la enzima provista por el sistema *TURBO DNA-free*<sup>™</sup> (Ambion) durante 30 minutos a 37°C. La inactivación de la DNAsa se realizó según las instrucciones con el reactivo de inactivación provisto por el fabricante. Se utilizaron 2  $\mu\text{l}$  de RNA, libre de DNA, para la reacción de RT.

$$\Psi_G = \frac{\text{RNA-genoma}_{\text{VIR.}}}{\text{RNA-genoma}_{\text{CEL.}}} = 100 \%$$

$$\Psi_M = \frac{\text{RNA-minigenoma}_{\text{VIR.}}}{\text{RNA-minigenoma}_{\text{CEL.}}}$$

$$\text{Eficiencia de encapsidación del minigenoma (\%)} = \frac{\Psi_M \times 100}{\Psi_G}$$

**Figura 10. Cálculo de la eficiencia de encapsidación de los minigenomas.** La encapsidación del genoma ( $\Psi_G$ ) se calcula como el cociente entre el RNA genómico en los viriones (RNA-genoma<sub>VIR.</sub>) respecto al RNA del genoma viral en células infectadas (RNA-genoma<sub>CEL.</sub>), expresado en unidades relativas de RNA en cada caso. La encapsidación del minigenoma ( $\Psi_M$ ) es la relación entre la cantidad de RNA del minigenoma en los viriones (RNA-minigenoma<sub>VIR.</sub>) respecto al RNA del minigenoma en células infectadas (RNA-minigenoma<sub>CEL.</sub>). La eficiencia de encapsidación (%) de cada minigenoma se calculó en referencia a la encapsidación del RNA genómico viral en cada muestra al que se asignó arbitrariamente el valor de 100%.

### 2.7.7. TRATAMIENTO CON RNAsa A DE VIRIONES

200  $\mu\text{l}$  de viriones purificados resuspendidos en TNE se incubaron durante 30 minutos a 37°C con 2  $\mu\text{g}$  de RNAsa A (Sigma). Posteriormente se añadieron 100 U del inhibidor de RNAsas *RNasin*® (Promega) y el RNA no digerido (protegido) se extrajo según el protocolo descrito en el apartado 2.7.2.

### 2.7.8. ENSAYO DE REPLICACIÓN DE MINIGENOMAS EN PASE P0

Se transfectaron 625 ng de plásmidos que expresaban los minigenomas derivados del TGEV bajo el promotor de CMV en células ST, y se procedió según lo descrito en el apartado 2.1.3. A las 6 hpt se infectaron las células con el virus complementador (apartado 2.2.3). Entre las 12-16 hpi se recogió el RNA de células transfectadas no infectadas y de células transfectadas infectadas. Los RNAs de los minigenomas se trataron con DNAsa

según lo descrito en el apartado 2.7.6. y se cuantificaron por RT-PCR en tiempo real con los oligonucleótidos específicos (Tabla 11).

La replicación de cada minigenoma se expresó como el incremento de moléculas de RNA en células infectadas y transfectadas respecto a los niveles del mismo RNA en células sólo transfectadas. Al incremento obtenido con el minigenoma M26 se le asignó el valor de 100% de replicación. La replicación de los otros genomas defectivos se expresó en porcentaje respecto al minigenoma M26.

#### **2.7.9. PREDICCIONES DE ESTRUCTURA SECUNDARIA DEL RNA CON EL PROGRAMA mFOLD (VERSIÓN 3.2)**

La predicción de estructura secundaria de RNA se realizó con el programa mFOLD 3.2 (Zuker, 2003) en la dirección <http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/>.

### **2.8. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE VIRIONES POR TINCIÓN NEGATIVA**

Las preparaciones de virus purificado se adsorbieron durante 2 minutos a rejillas de cobre-carbono activadas mediante luz ultravioleta utilizando un irradiador vacío (BALZERS) y se lavaron 2 veces con agua destilada, en tampón PBS, durante 1 segundo en cada lavado. Las muestras se tiñeron negativamente durante 30 segundos con ácido fosfotúngstico al 2%. Los virus se visualizaron en un microscopio electrónico de transmisión JEOL 1200 EX II, tomándose fotografías representativas.

*resultados*



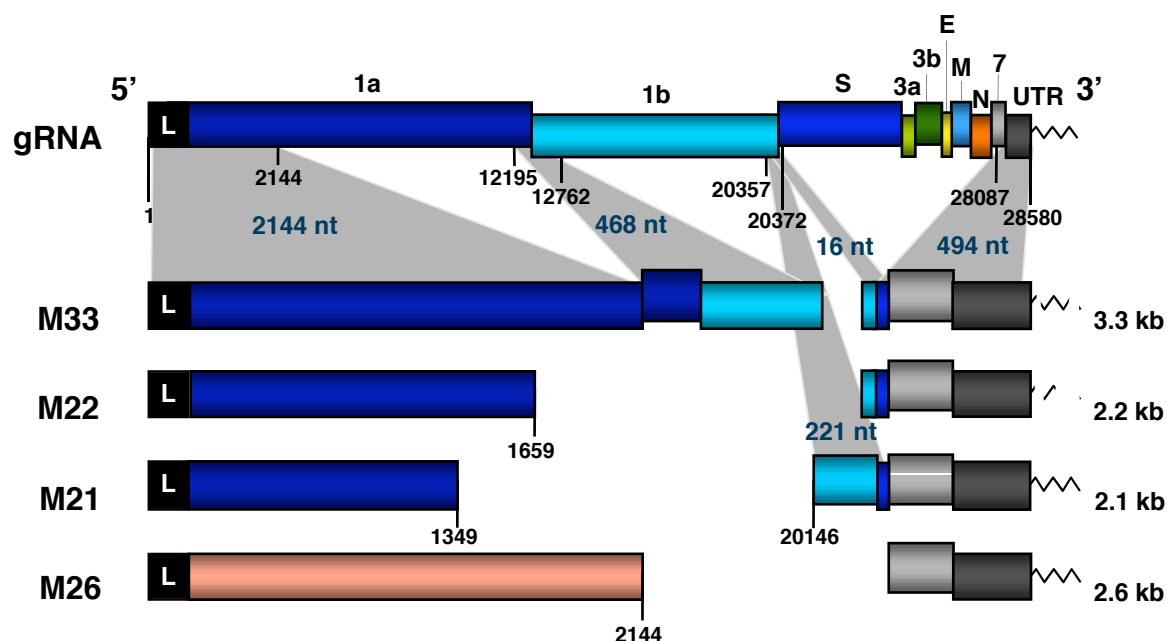


### 3.1. ESTUDIO DE LAS SECUENCIAS MÍNIMAS NECESARIAS PARA EL RESCATE DE MINIGENOMAS DERIVADOS DEL TGEV

La localización de señales en *cis* para la replicación y encapsidación del virus TGEV se inició utilizando una colección de minigenomas sintéticos derivados del virus (Izeta y col., 1999). Estos genomas defectivos mantenían intactos los extremos 5' y 3' aunque presentaban grandes deleciones internas respecto al genoma viral completo. Se estudió el rescate de minigenomas por un virus complementador en cultivos celulares. Los minigenomas rescatados contenían las secuencias necesarias para la replicación y la encapsidación viral. El minigenoma de menor tamaño rescatado eficientemente se denominó M33 e incluía 3.3 kb del genoma viral (Fig. 11). Partiendo de este minigenoma se propuso delimitar las secuencias en *cis* requeridas para la replicación y encapsidación del TGEV.

#### 3.1.1. REQUERIMIENTO DE LOS EXTREMOS 5' Y 3' PARA EL RESCATE EN TRANS DE MINIGENOMAS. GENERACIÓN DEL MINIGENOMA SINTÉTICO M26

Para determinar si únicamente los extremo 5' y 3' del genoma del TGEV son suficientes para la replicación y encapsidación de genomas defectivos, se construyó el minigenoma M26 (Fig. 11), derivado del genoma defectivo M33, en el que se habían eliminado las secuencias discontinuas internas del genoma. El minigenoma M26, de 2.6 kb, contenía: (i) en el extremo 5', los nucleótidos 1 a 2144 del genoma del TGEV, que incluían la secuencia líder, la región 5'-UTR completa y los primeros nucleótidos de la ORF 1a y, (ii) en el extremo 3', los 494 últimos nucleótidos del virus, incluyendo un fragmento de la ORF 7 y la región 3'-UTR completa (Fig. 11). El minigenoma M26 tenía una longitud superior a la de los minigenomas más pequeños analizados en el laboratorio, M22 (2.2 kb) y M21 (2.1 kb) (Fig. 11), que eran rescatados con baja eficiencia (Izeta y col., 1999). A lo largo de la secuencia no existía ninguna TRS que transcribiera RNAs subgenómicos a partir del minigenoma M26. El extremo 5' del genoma defectivo M26 incluía el inicio de la traducción de la ORF 1a de forma que, teóricamente, daría lugar a una proteína trunca de 612 aa, que corresponde al extremo amino terminal de la replicasa. Entre los extremos 5' y 3' del minigenoma M26 se incluyó una secuencia espaciadora de 60 nt (procedente del entorno de la región de clonaje en el plásmido pGEM-T), ausente en el genoma viral, para



**Figura 11. Esquema de los minigenomas sintéticos M33, M22, M21 y M26, derivados del TGEV.** Se muestra el genoma completo (gRNA) del TGEV con las ORFs correspondientes y los minigenomas M33, M22 y M21 derivados del mismo, descritos previamente (Izeta y col., 1999). El minigenoma M26 se construyó a partir del genoma defectivo M33 por eliminación de las regiones internas discontinuas de 468 nt y 16 nt. Entre las regiones 5' y 3' se introdujo una secuencia espaciadora de 60 nt (no representada). Los números indican la posición, en nt, en el genoma viral. A la derecha se indica el tamaño, en kilobases (kb), de cada minigenoma. Cada una de las regiones del genoma defectivo M33 está sombreada indicando su procedencia dentro del genoma del virus. Dentro de cada una de estas regiones se indica su tamaño en nt. L, secuencia líder.

permitir el diseño de oligonucleótidos que discriminaran específicamente entre el minigenoma M26 y el virus complementador TGEV en ensayos de RT-PCR.

El cDNA del genoma defectivo M26 se clonó en el plásmido pcDNA3 bajo el promotor inmediato-temprano de citomegalovirus (CMV) (Dubensky y col., 1996), que es reconocido por la RNA polimerasa II celular (*pol II*) en el núcleo de célula. El clonaje se realizó de manera que el extremo 5' del RNA del minigenoma M26 transcrito por la *pol II* fuera idéntico al extremo 5' viral, sin incluir nucleótidos adicionales de origen no viral. Para ello se generó una construcción similar a la utilizada previamente en el laboratorio para transcribir el minigenoma M33 desde el plásmido pSL (Izeta y col., 1999), basada a su vez en la empleada para la expresión de RNAs sintéticos del alfavirus Sindbis (Dubensky y col., 1996; Penzes y col., 1998). Aunque el primer nucleótido del RNA transcrito a partir de

estas construcciones no se ha confirmado experimentalmente, los análisis de construcciones similares en las que se ha expresado el cDNA infeccioso viral bajo el promotor de CMV en el plásmido pBeloBAC mostraron que la primera base transcrita es adenina (Almazán y col., 2000), que corresponde al primer nucleótido del TGEV. Adicionalmente, un argumento a favor de la correcta transcripción del extremo 5' de los minigenomas desde el promotor de CMV, son los datos previos de rescate eficiente de algunos minigenomas amplificados mediante este sistema, como el genoma defectivo M33 (Izeta y col., 1999). En la región 3' del minigenoma M26 se añadió una cola de 25 adeninas (Izeta y col., 1999) para mimetizar el extremo 3' del virus. A continuación se introdujo la ribozima del virus de la hepatitis delta para el correcto procesamiento del extremo 3' del minigenoma, y la señal de terminación de la transcripción y poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (BGH) (Miller y col., 1980; Sasavage y col., 1980; Woychik y col., 1982).

Se estableció un sistema de amplificación de minigenomas en dos etapas, como había sido descrito anteriormente (Izeta y col., 1999; Alonso y col., 2002). Las células se transfectan con los plásmidos que expresan los genomas defectivos y posteriormente se infectan con el virus complementador. En una primera etapa, se transcribe el RNA del minigenoma por la *pol* II en el núcleo celular. En una segunda etapa, las moléculas de RNA del genoma defectivo son translocadas al citoplasma donde, en el caso de incluir señales *cis* para el proceso de replicación, son re-amplificadas por la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) del virus complementador. Finalmente, las moléculas de minigenoma que incluyan también señales de encapsidación se empaquetan por el virus complementador y se amplifican en sucesivos pases en cultivos celulares.

### 3.1.2. RESCATE DEL GENOMA DEFECTIVO M26

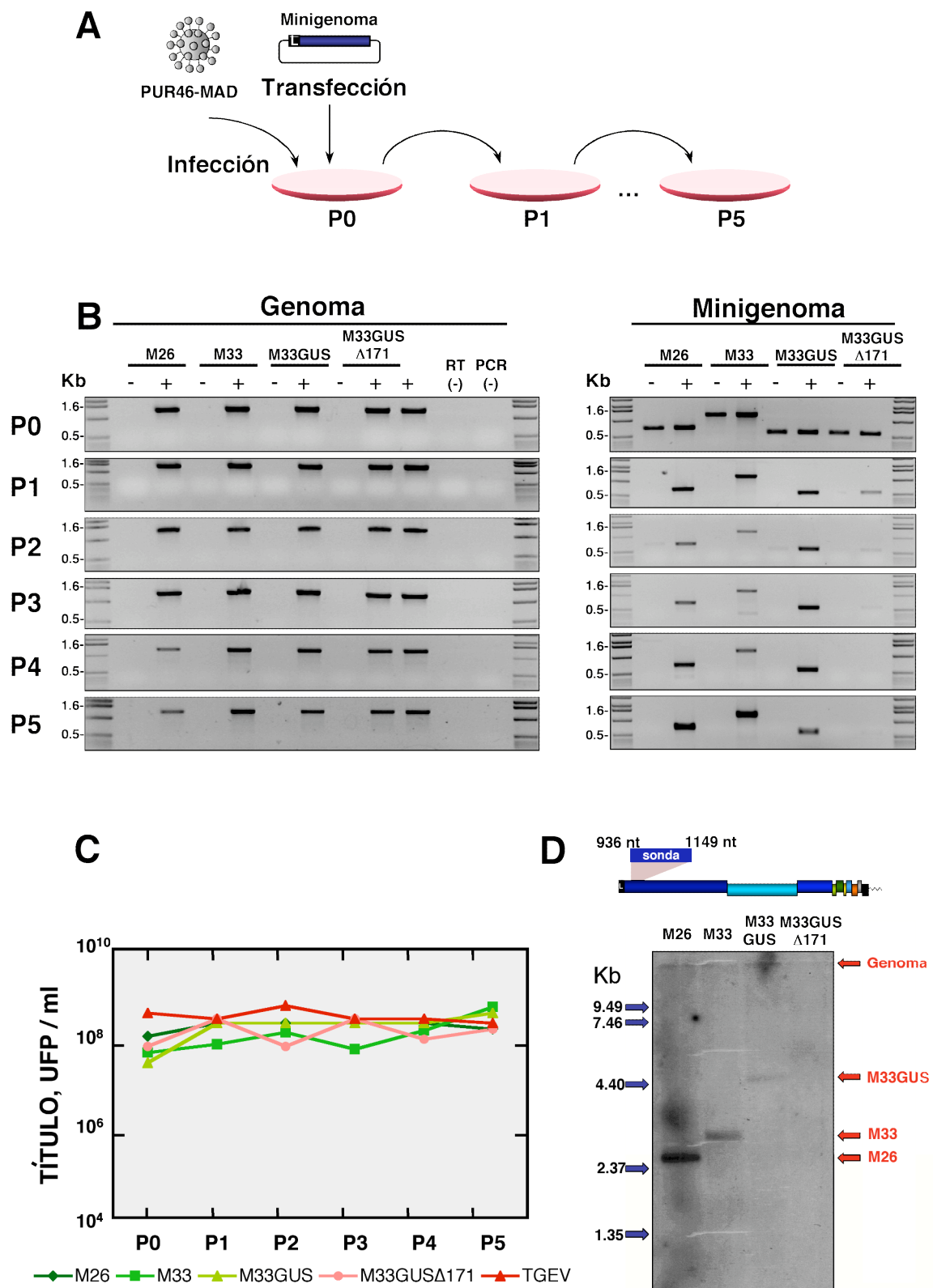
El minigenoma M26 se analizó en experimentos de rescate *in trans* con un virus complementador (Fig. 12A). Células ST se transfectaron con los plásmidos que expresaban el RNA de los minigenomas y se infectaron posteriormente con el virus PUR46-MAD (md1 5). Un tercio del sobrenadante obtenido en el pase de la transfección, o pase P0, se utilizó para infectar nuevas células ST confluentes y producir sobrenadantes de pase P1. El proceso se repitió hasta pase P5. Como controles positivos de rescate se utilizaron los minigenomas M33 (Izeta y col., 1999) y M33GUS. El genoma defectivo M33GUS contenía la secuencia del minigenoma M33 y el gen GUS entre los extremos 5' y 3', como un espaciador. El minigenoma M33GUS $\Delta$ 171, con una delección entre los nucleótidos 192-21

## resultados

de la región 3'-UTR, se utilizó como control negativo de rescate. Se ha descrito que la región delecionada incluye motivos conservados, esenciales para la replicación de otros CoVs (Hsue y Masters., 1997; Williams y col., 1999). Además, también se ha comprobado el requerimiento de esta secuencia para la replicación del TGEV (Izeta y col., 1999). Paralelamente se infectaron células sin transfectar para determinar el fondo inespecífico de la reacción de RT-PCR en la detección de los minigenomas. Como un control adicional del experimento, células sin infectar se transfectaron con los plásmidos expresando los minigenomas, para determinar la amplificación debida a un arrastre del DNA transfectado. En cada caso los sobrenadantes, con o sin infección, se pasaron como se ha descrito anteriormente.

El RNA de las células de los distintos pases seriados (pase P0 a pase P5) se analizó por RT-PCR cualitativa con los oligonucleótidos descritos en la Tabla 9 de *Materiales y Métodos*, para determinar la presencia del genoma viral y los minigenomas. Para la detección de los minigenomas M33 y M26 se utilizaron oligonucleótidos que hibridaban en el extremo 5' y 3' común a los dos genomas defectivos, lo que amplificaba dos bandas de diferente tamaño. Para la detección del minigenoma M33GUS se utilizó el mismo oligonucleótido complementario al extremo 3' y un oligonucleótido que hibridaba en el gen GUS. El genoma del virus complementador se detectó en todas las células infectadas y a lo

**Figura 12. Rescate en *trans* de los minigenomas M26, M33, M33GUS y M33GUSA171.** (A) Esquema del sistema de amplificación de minigenomas en dos etapas. En el pase P0 se transfectaron los plásmidos que expresaban el RNA de los minigenomas desde el promotor de CMV por la *pol* II celular. Las células se infectaron con el virus complementador PUR46-MAD y posteriormente el sobrenadante se pasó de forma seriada cinco veces en células ST (pase P1 a pase P5). (B) Análisis por RT-PCR de la presencia del genoma del virus complementador (izquierda) o del RNA del correspondiente minigenoma (derecha). (+), células infectadas; (-), células no infectadas; RT(-), control de RNA no sometido a la reacción de síntesis de cDNA por la transcriptasa reversa; PCR(-), control de RNA copiado a cDNA pero no amplificado por la reacción de PCR. Se muestra un resultado de rescate representativo de, al menos, tres experimentos independientes. (C) Titulación de los sobrenadantes de cada pase seriado. TGEV, células no transfectadas e infectadas con el virus complementador. (D) Análisis por transferencia e hibridación de RNAs (*Northern blot*) de la presencia de los minigenomas en las células de pase P5. En el esquema de la parte superior se muestra la localización de la sonda en el genoma viral. Los números indican las posiciones, en nt, del genoma del TGEV. A la izquierda se indica el tamaño de los marcadores de RNA (kb). A la derecha se muestra la posición esperada para el genoma del virus y los minigenomas ensayados.



## **resultados**

largo de, al menos, cinco pases (Fig. 12B), como era esperado. El minigenoma M26 se amplificó por RT-PCR a partir del RNA celular de todos los pases analizados, al igual que los controles positivos M33 y M33GUS (Fig. 12B). Por el contrario, el RNA del minigenoma control negativo (M33GUS $\Delta$ 171) dejó de amplificarse por RT-PCR a partir de pase P2. La detección de los minigenomas M26, M33 y M33GUS no se debió a un arrastre del plásmido transfectado puesto que, en las células transfectadas no infectadas, el minigenoma expresado desde el plásmido sólo se detectó en pase P0. Los resultados de estos experimentos mostraron que el genoma defectivo M26 contiene en su secuencia las señales necesarias para el rescate, es decir, la replicación y la encapsidación por el virus complementador. Por tanto, las regiones internas del genoma viral incluidas en el minigenoma M33 no son necesarias para el rescate.

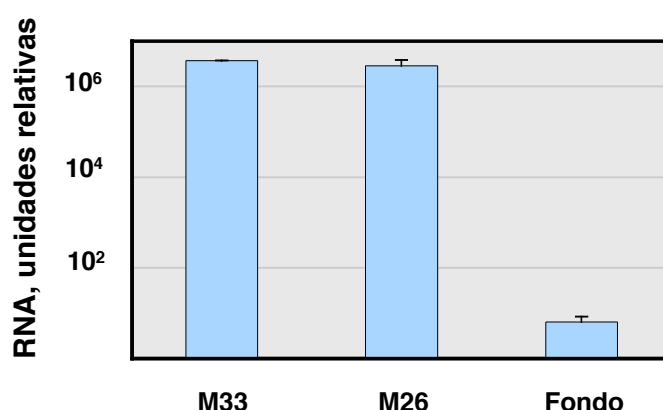
No se detectaron diferencias significativas entre los títulos del virus complementador en cada caso (Fig. 12C). En todos los pases el virus presentaba títulos de entre  $10^8$  y  $10^9$  UFP/ml, similares a los del virus en células no transfectadas, si bien algunos minigenomas rescatados disminuían en determinados pases el título del virus complementador aproximadamente 0.5 unidades logarítmicas.

Con el objeto de analizar la naturaleza de las especies de RNA rescatadas, se realizó un experimento de transferencia e hibridación (*Northern blot*) de los RNAs de pase P5, con una sonda complementaria al extremo 5' del gen de la replicasa. La sonda hibridaría, por tanto, con el RNA genómico viral así como con el RNA de los minigenomas rescatados. Los resultados del *Northern blot* determinaron que el genoma defectivo M26 mantenía el tamaño correcto después de cinco pases de rescate en cultivos celulares. No se observaron especies recombinantes de diferente tamaño al esperado para el minigenoma M26 (Fig. 12D).

El RNA de pase P5 del genoma defectivo M26 se secuenció prácticamente en su totalidad y no se observó ningún cambio de nucleótidos a lo largo de la secuencia analizada respecto a la secuencia contenida en el plásmido transfectado en pase P0. Aunque no se determinó la secuencia de los extremos del minigenoma M26, debe ser la secuencia correcta, dado que el minigenoma es eficazmente replicado por el virus complementador y la replicación requiere que los extremos del RNA sean correctos.

### **3.1.3. CUANTIFICACIÓN RELATIVA DEL RESCATE DE MINIGENOMAS EN TRANS**

Para determinar con precisión las diferencias en la eficiencia de rescate de los minigenomas M26 y M33 y aumentar la sensibilidad estos ensayos, se empleó un análisis por RT-PCR cuantitativa o en tiempo real. Como primer objetivo, se propuso comparar cuantitativamente el rescate de los minigenomas M33 y M26 y determinar si la eficiencia de rescate era exactamente igual para ambos. Se optimizó un ensayo de RT-PCR cuantitativa en el que las especies de RNA de M33 y M26 se detectaban con la misma pareja de oligonucleótidos específicos. Para ello se generó un nuevo minigenoma M33 que incluía entre los extremos 5' y 3' la región espaciadora de 60 nt idéntica a la existente en el minigenoma M26 y cuya secuencia no estaba presente en el genoma viral (apartado 2.5. de *Materiales y Métodos*). El amplicón detectado por RT-PCR cuantitativa se diseñó entre la secuencia espaciadora específica de los genomas defectivos M26 y M33, y ausente del genoma viral, y el extremo 3' del minigenoma.



**Figura 13. Cuantificación relativa por RT-PCR en tiempo real del rescate de los minigenomas M33 y M26 en P3.** La cantidad relativa de cada minigenoma se determinó por RT-PCR en tiempo real, utilizando la misma pareja de oligonucleótidos. Se representa el promedio de tres experimentos independientes con su desviación estándar. Fondo, células infectadas sin transfección previa de minigenoma. Representan el nivel de fondo de RNA debido a hibridación inespecífica o a dímeros de los oligonucleótidos.

Los minigenomas M26 y M33 se analizaron mediante el protocolo de rescate descrito en el apartado anterior. La cantidad relativa de RNA de los minigenomas M33 y M26 se determinó en células de pase P3 (Fig. 13). Se observó que los niveles relativos de RNA de ambos minigenomas eran similares. Por tanto, los genomas defectivos M33 y M26 se rescataron con la misma eficiencia por el virus complementador. Estos resultados

confirmaron que las secuencias internas del minigenoma M33 carecen de señales en *cis* necesarias para el rescate de minigenomas derivados de TGEV. Las señales requeridas para la replicación y encapsidación de minigenomas por el virus complementador y, presumiblemente, para el genoma viral, se localizaron exclusivamente en los 2144 nt del extremo 5' y en los 494 nt del extremo 3'.

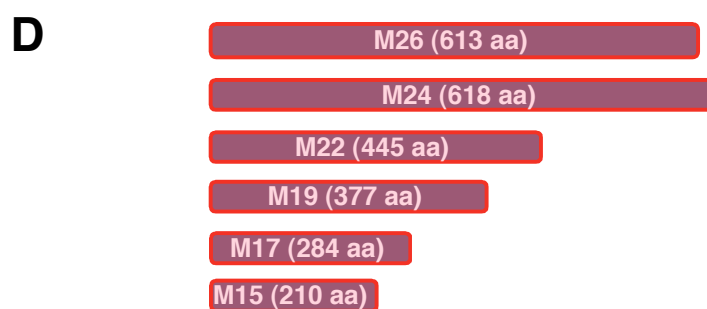
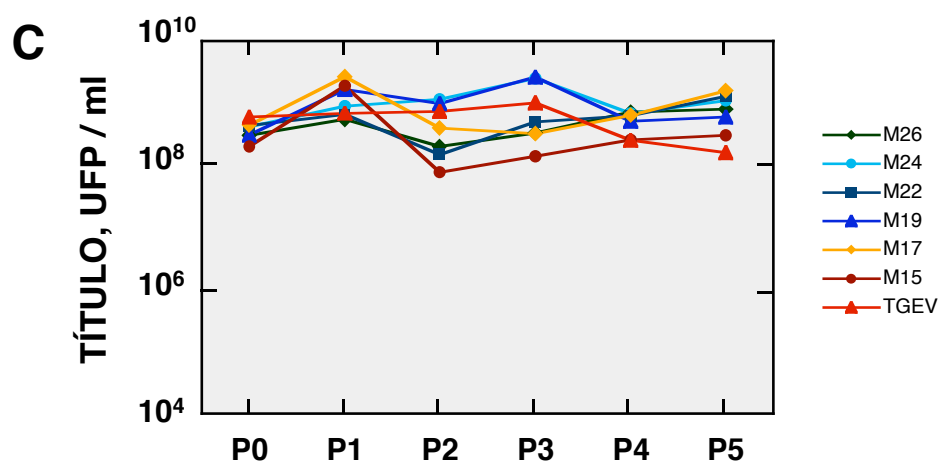
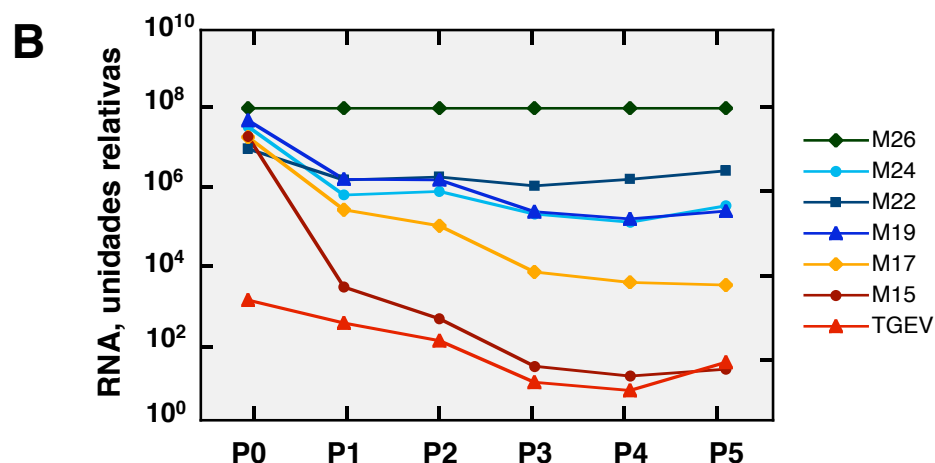
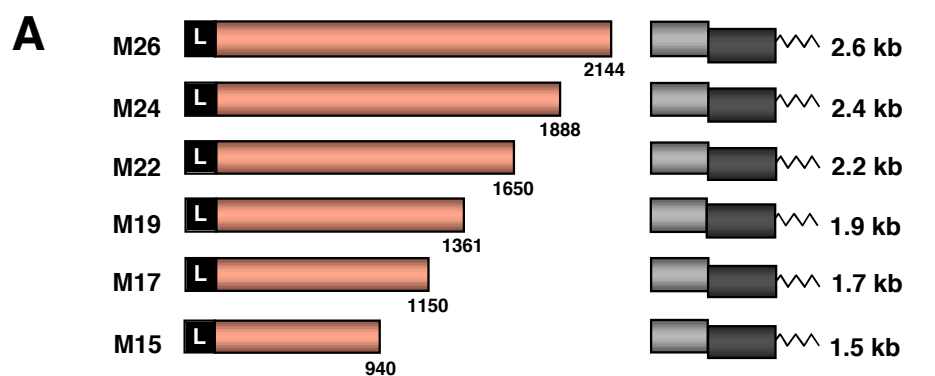
### **3.1.4. DELIMITACIÓN DE LA SECUENCIA DEL EXTREMO 5' REQUERIDA PARA EL RESCATE EN *TRANS* DE MINIGENOMAS SINTÉTICOS**

Para determinar la mínima secuencia del extremo 5' necesaria para el rescate en *trans* de minigenomas con un virus complementador se generó una colección de genomas defectivos con deleciones crecientes en el extremo 5' del minigenoma M26, y se analizó su rescate en cultivos celulares. Los minigenomas generados se designaron M24, con 1888 nt del extremo 5', M22 (1650 nt), M19 (1361 nt), M17 (1150 nt) y M15 (940 nt) (Fig. 14A). Todas los genomas defectivos se clonaron en plásmidos pcDNA3 como se describió para el minigenoma parental M26 (apartado 3.1.1 de *Resultados*). Entre los extremos 5' y 3', se incluyó la secuencia espaciadora de 60 nt, ausente en el genoma del TGEV. La longitud total de cada minigenoma, en kb, venía indicada en su nombre, siendo M24 un minigenoma de 2.4 kb, M22 de 2.2 kb, y así sucesivamente.

Cada uno de los genomas defectivos sintéticos generados se analizó en experimentos de rescate en *trans* con el virus complementador PUR46-MAD, como se ha descrito

**Figura 14. Rescate en *trans* de los minigenomas derivados del genoma defectivo M26 delecionados en el extremo 5'.** (A) Esquema de los minigenomas M24, M22, M19, M17 y M15 obtenidos a partir del minigenoma M26 por deleciones crecientes en el extremo 5'. El minigenoma M22 no posee exactamente la misma secuencia que el descrito previamente (Izeta y col., 1999), aunque tiene un tamaño similar (2.2 kb). A la izquierda se indican los nombres de los minigenomas y a la derecha su tamaño (en kb). Los números indican posiciones, en nt, en el genoma de M26. L, secuencia líder. (B) Análisis por RT-PCR cuantitativa de los niveles de RNA de cada minigenoma en los pases seriados P0 a P5. Los resultados se normalizaron respecto al nivel de RNA del genoma defectivo M26 en cada pase. TGEV, RNA de células infectadas y no transfectadas con el cDNA de ningún minigenoma. Se muestra un resultado representativo de, al menos, tres experimentos independientes. (C) Título viral de los sobrenadantes generados en cada pase del experimento de rescate. (D) Longitud, en aminoácidos (aa), de la proteína traducida, teóricamente, a partir de la secuencia de cada minigenoma.





previamente. El nivel relativo de RNA de cada minigenoma en células infectadas se analizó por RT-PCR en tiempo real, desde el pase P0 al pase P5 (Fig. 14B). Para la cuantificación de todos los minigenomas se utilizó la misma pareja de oligonucleótidos, que amplifica específicamente la secuencia comprendida entre la región espaciadora de 60 nt y el extremo 3', como se describió en el apartado 3.1.3.

Todos los genomas defectivos generados se rescataron con eficiencias significativamente inferiores a las del minigenoma parental M26. Ninguno de los minigenomas interfirió apreciablemente en el crecimiento del TGEV (Fig. 14C). Los minigenomas M24, M22 y M19 se mantuvieron en niveles similares desde pase P0 a pase P5, aproximadamente 100 veces por debajo del genoma defectivo M26. Únicamente el genoma defectivo M17 se detectó a un nivel basal, 1000 veces inferior al minigenoma M26, aunque se mantenía con los pases sin perderse. Por el contrario, el minigenoma M15 mostraba, desde pase P1, niveles de RNA semejantes a los del control negativo (células infectadas no transfectadas). Los resultados de este experimento indican que la mínima secuencia del extremo 5' necesaria para el rescate en *trans* de minigenomas derivados del TGEV es de 1150 nt, la correspondiente al genoma defectivo M17. Por tanto, esta secuencia debe contener las señales mínimas de replicación y encapsidación. Regiones más cortas del extremo 5' que la descrita generan minigenomas que no se rescatan, como el genoma defectivo M15, que no se mantiene a lo largo de los pases por la pérdida de señales en *cis* fundamentales para la replicación, encapsidación o ambas. No obstante, no se puede descartar que una menor eficiencia de rescate de un minigenoma pueda deberse a un incorrecto plegamiento de su RNA, pese a que contenga las secuencias mínimas directamente implicadas en el rescate. El genoma defectivo M22 es un ejemplo de esta posibilidad puesto que, pese a tener menos longitud en su extremo 5' que el minigenoma M24, se rescató más eficientemente.

En el BCoV y en arterivirus se ha descrito que el rescate de genomas defectivos depende de la longitud de la ORF traducida por el minigenoma (Chang y col., 1996; Molenkamp y col., 2000), y que una ORF amplia es un requerimiento para la replicación. En el TGEV no parece existir este requerimiento, dado que el minigenoma M24 traduce un polipéptido de mayor longitud que el del genoma defectivo M26 (Fig. 14D) y, sin embargo, el minigenoma M26 incluye el RNA rescatado más eficientemente.

Los minigenomas M24, M22 y M19, rescatados en pase P5, se secuenciaron y no se encontraron cambios de nucleótidos respecto a la secuencia original transfectada.

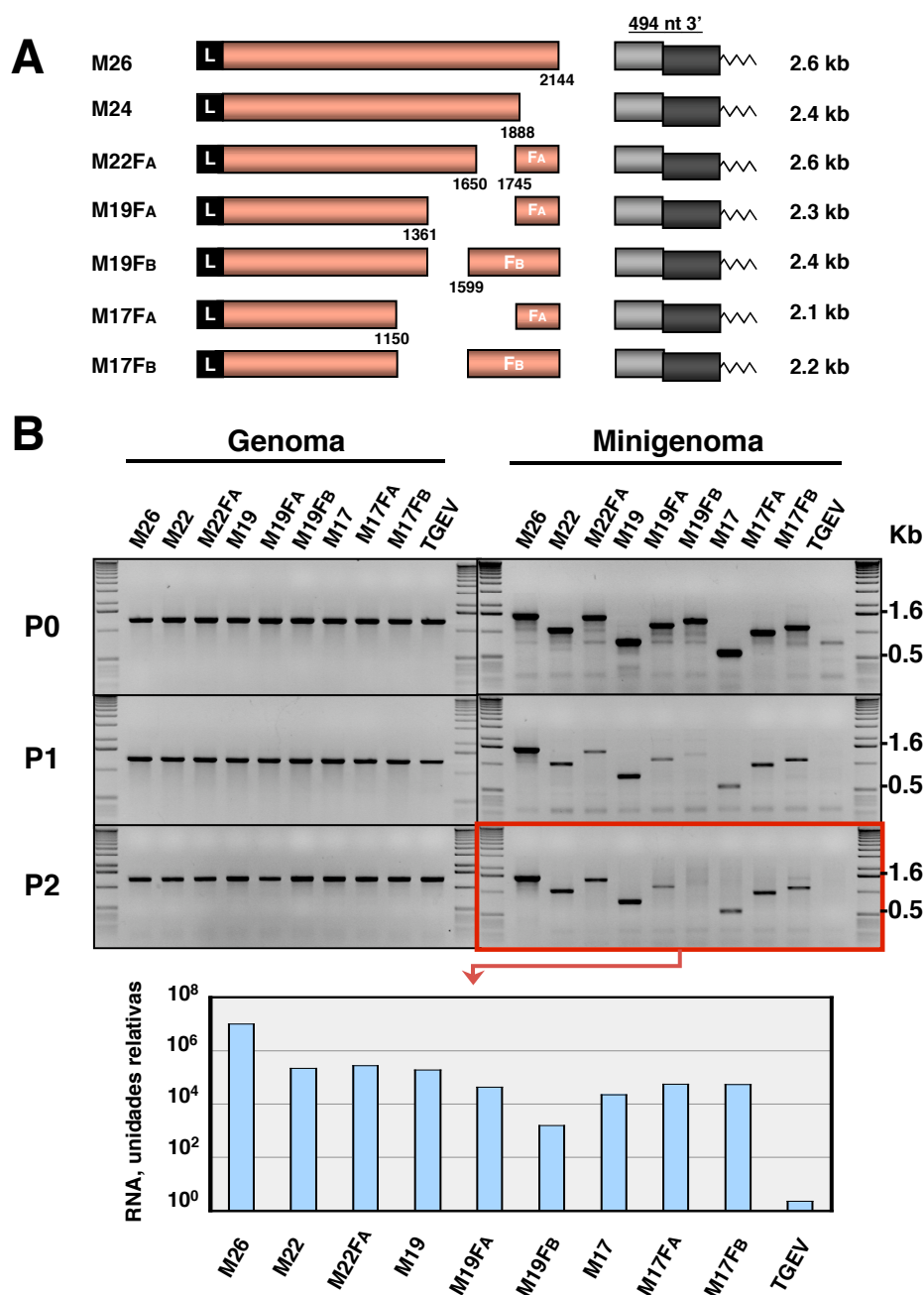
De los resultados se dedujo que los niveles de RNA en el pase P2 de un determinado minigenoma ya eran indicativos del comportamiento del genoma defectivo, no siendo imprescindible la evaluación hasta pase P5. En los sucesivos experimentos de rescate de minigenomas en *trans* se muestran los resultados de RT-PCR cualitativa hasta el pase P2-P3 y, en algunos casos, hasta el pase P5.

### 3.1.5. SECUENCIAS CANDIDATAS PARA AUMENTAR LA EFICIENCIA DEL RESCATE EN *TRANS*: REGIONES FA Y FB

Los resultados anteriores sugirieron la posible relevancia para un rescate eficiente de minigenomas de la secuencia 5' presente en el minigenoma M26 y ausente en el minigenoma M24, rescatado menos eficientemente (nt 1888 a 2144), dado que esta es la única diferencia de secuencia entre ambos minigenomas (Fig. 15A). Adicionalmente, y puesto que el minigenoma M17 rescataba menos eficientemente que los genomas defectivos M24, M22 y M19, este último con una longitud parecida a la del minigenoma M17, se propuso el estudio de la relevancia en el rescate de una región más amplia, la que comprendía la diferencia entre los minigenomas M26 y M22 (nt 1650 a 2144). El fragmento A (FA) se definió como la secuencia diferencial de M26 respecto a M24, y el fragmento B (FB), representado por la región que diferencia los minigenomas M26 y M22.

La región FA se introdujo en los minigenomas M22, M19 y M17 y la región FB en los genomas defectivos M19 y M17 (Fig. 15A), con el objeto de analizar si la adición de dichas secuencias mejoraba los niveles relativos de rescate de estos minigenomas, hasta aproximarlos o igualarlos a los del minigenoma parental M26. En el diseño de las regiones FA y FB se tuvo en cuenta la necesidad de un correcto plegamiento de estos fragmentos de RNA, por lo que, en ambos casos, el fragmento que se introdujo en los minigenomas M22, M19 y M17 era unos 50-100 nt más largo en su extremo 5'. El extremo 3' se mantuvo igual que el extremo 3' de la región 5' incluida en el minigenoma M26, que es eficientemente rescatado.

El rescate de estas construcciones en *trans* por un virus complementador se analizó por RT-PCR cualitativa y por RT-PCR en tiempo real del RNA de células infectadas de pase P2 (Fig. 15B). En ambos casos se observó que la introducción de las secuencias FA y FB no aumentaba la eficiencia del rescate de los minigenomas que las contenían (la mayor o menor intensidad de las bandas estaba relacionada con una mayor o menor cantidad relativa

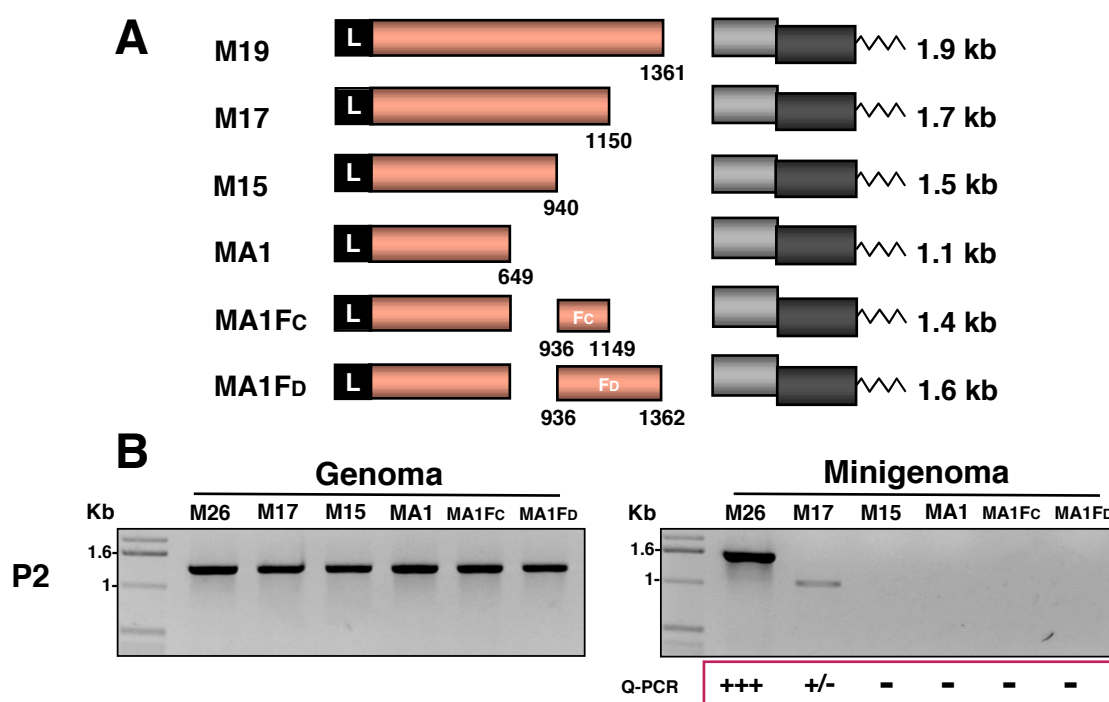


**Figura 15. Influencia de las regiones FA y FB en el rescate de minigenomas por un virus complementador.** (A) Esquema de los minigenomas M22FA, M19FA, M19FB, M17FA y M17FB generados por adición de las regiones FA o FB a los genomas defectivos M22, M19 y M17, respectivamente. A la derecha se indica el tamaño de cada construcción, en kb. Los números indican posiciones en el genoma de M26, en nt. (B) Se determinó la presencia del RNA genómico del virus complementador (izquierda) y del RNA de los genomas defectivos generados y de sus parentales M22, M19 y M17 (derecha) en los pases P0 a P2. La gráfica inferior muestra la cuantificación por RT-PCR en tiempo real de los RNAs de los genomas defectivos (enmarcados en rojo). El resultado se reprodujo en tres experimentos independientes. TGEV, infección en ausencia de minigenoma.

de cada especie de RNA). No obstante, no se podía descartar que el RNA no se estuviera plegando de manera adecuada. Esta observación estaría apoyada por los resultados obtenidos con el minigenoma M19Fb que, pese a tener más secuencia que el genoma defectivo M19, se rescató con menos eficiencia. En todos los casos se comprobó que los títulos del virus complementador superaban  $10^8$  UFP/ml (resultados no mostrados).

### 3.1.6. REQUERIMIENTO DE LAS REGIONES Fc Y Fd EN EL RESCATE DE MINIGENOMAS

El minigenoma MA1, que incluye 649 nt en el extremo 5', carecía de algunas regiones imprescindibles para el rescate, según experimentos preliminares realizados en esta tesis (resultados no mostrados). La adición de secuencias presentes en otros minigenomas que



**Figura 16. Requerimiento para el rescate en *trans* de minigenomas de las regiones Fc y Fd.** (A) Esquema de los minigenomas. A la izquierda se indica el nombre y a la derecha el tamaño, en kb. Los números indican, en nt, las posiciones en el genoma. (B) Análisis por RT-PCR cualitativa del genoma viral (izquierda) y de los minigenomas (derecha) M26, M17, M15, MA1, MA1Fc y MA1Fd en el pase P2 del experimento de rescate. En el recuadro inferior se muestran los niveles de rescate medidos por PCR en tiempo real (Q-PCR), donde el rescate eficiente del minigenoma M26 se representa como (+++); (+/-) y (-) indican valores de rescate entre 500 y 1000 veces inferiores, respectivamente. El mismo resultado se obtuvo en, al menos, tres experimentos independientes. L, secuencia líder.

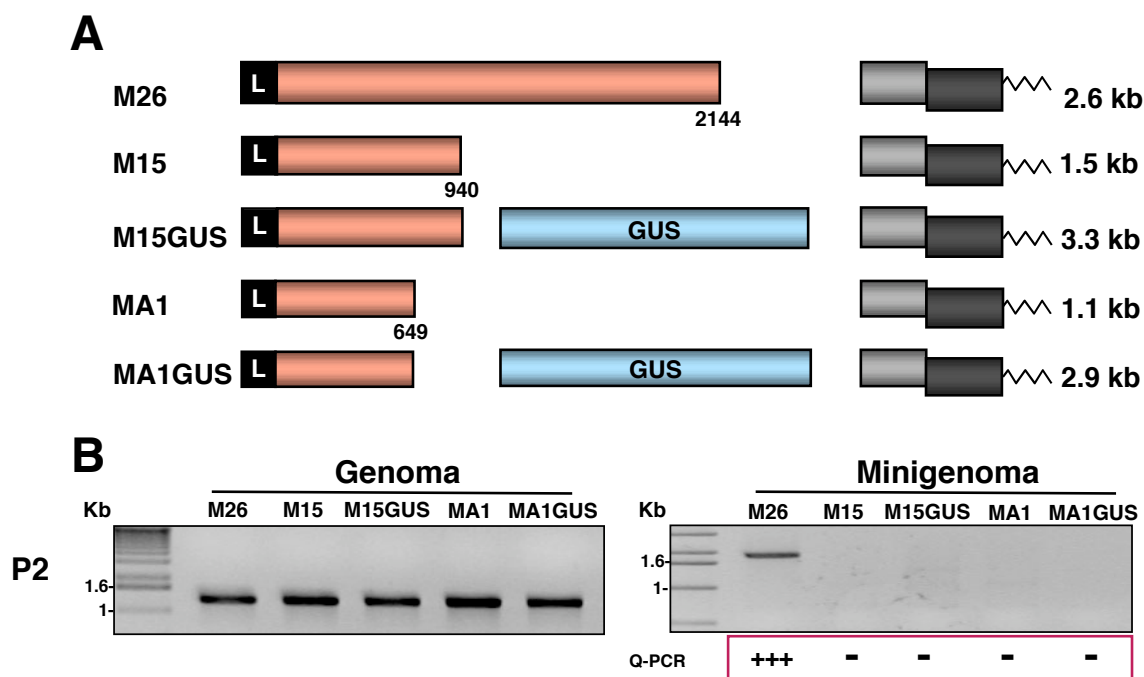
rescataban podría revertir su rescate en cultivos celulares. Los fragmentos C y D (FC y FD) se definieron como las regiones diferenciales de los minigenomas M15 y M17 (nt 940 a 1150) y entre los genomas defectivos M15 y M19 (nt 940 a 1361), respectivamente.

El análisis del RNA de pase P2 de las construcciones anteriores reveló que en ningún caso se revertía el comportamiento del genoma defectivo MA1 por introducción de las secuencias FC y FD. El análisis por RT-PCR en tiempo real confirmó este resultado (Fig. 16). Se comprobó que el título del virus complementador superó  $10^8$  UFP/ml en todos los pases dados (resultados no mostrados).

### **3.1.7. TAMAÑO MÍNIMO REQUERIDO PARA EL RESCATE EN *TRANS* DE MINIGENOMAS: INSERCIÓN DEL GEN DE LA $\beta$ -GLUCURONIDASA EN LOS GENOMAS DEFECTIVOS**

El minigenoma M15, de 1.5 kb, se detectaba al mismo nivel que el fondo de la reacción de RT-PCR a partir de pase P1, pese a la presencia del virus complementador (Fig. 14B). Igual ocurría con el minigenoma MA1 (1.1 kb), descrito en los apartados anteriores (Fig. 16 y 17). Esto podía ser debido a la pérdida de señales en *cis* necesarias para la replicación o la encapsidación, o a la necesidad de un tamaño mínimo para que las moléculas de RNA fuesen replicadas por el virus, encapsidadas en el virión, o para ambos procesos. Para descartar la hipótesis de que el tamaño fuese determinante en el rescate se introdujo el gen GUS en el minigenoma M15, denominándose M15GUS. Este gen introducía 1.8 kb de secuencia, con lo que se generaba un minigenoma de 3.3 kb, de igual tamaño al del genoma defectivo M33, muy eficientemente rescatado en *trans*. Asimismo, en experimentos anteriores (Alonso y col., 2002) se había mostrado que las secuencias del gen GUS eran aceptadas (no tóxicas) para la amplificación de minigenomas que los contienen. El gen GUS también se introdujo en el minigenoma MA1, sumando la nueva construcción un total de 2.9 kb, por encima de las 2.6 kb del minigenoma M26.

El minigenoma M15GUS, al igual que el minigenoma M15, se perdió en pases tempranos (pase P1-P2) cuando era complementado en *trans* por el virus PUR46-MAD. Los resultados se observaron en análisis por RT-PCR convencional visualizados en geles de agarosa y también por RT-PCR en tiempo real (Fig. 17). El minigenoma MA1-GUS tampoco se rescató por el virus complementador. Por tanto, el tamaño no era responsable del ineficiente rescate de los genomas defectivos. Los minigenomas carecían de la secuencia o de la estructura secundaria necesaria para su rescate en cultivos celulares.



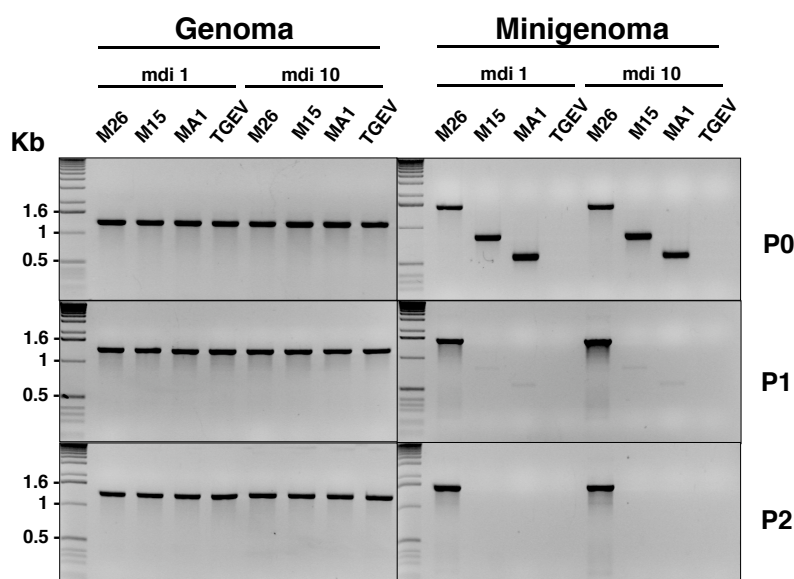
**Figura 17. Influencia del tamaño de los minigenomas en su rescate por el virus complementador.** (A) Esquema de los minigenomas analizados. A la izquierda se indica su nombre y a la derecha su tamaño, en kb. Los números indican, en nt, las posiciones en el genoma. GUS, fragmento del gen de la  $\beta$ -glucuronidasa. (B) Análisis por RT-PCR del genoma del RNA del virus complementador (izquierda) y de cada uno de los minigenomas (derecha) en el pase P2 del rescate. En el recuadro inferior se muestran los niveles de rescate medidos por PCR en tiempo real (Q-PCR), donde el rescate eficiente del minigenoma M26 se representa como (+++) y (-) indica valores de rescate 1000 veces inferiores. El mismo resultado se obtuvo en, al menos, tres experimentos independientes.

### 3.1.8. INFLUENCIA DE LA MULTIPLICIDAD DE INFECCIÓN EN EL RESCATE DE GENOMAS DEFECTIVOS

Experimentos previos en el laboratorio habían demostrado que los minigenomas requerían de una alta mdi del virus complementador para su eficiente rescate, siendo la multiplicidad infección mínima para un rescate óptimo de 0.25 (A. Izeta y L. Enjuanes, resultados no publicados).

Se ensayaron dos multiplicidades de infección diferentes ( $mdi = 1$  y  $mdi = 10$ ) del virus complementador para determinar si la pérdida del minigenoma M15 en pase P1-P2 podía revertirse a multiplicidades más altas de las que se estaban utilizando. La mayor multiplicidad de infección ensayada ( $mdi = 10$ ) no revirtió el rescate ineficiente de los minigenomas MA1 y M15 (Fig. 18). Los minigenomas que se perdían con los pases

carecían de secuencias en *cis* importantes para el rescate o el RNA no adquiriría la estructura secundaria necesaria.



**Figura 18. Influencia de la mdi en el rescate de minigenomas.** Análisis por RT-PCR cualitativa del rescate de los minigenomas M26, M15 y MA1 en los pases P0 a P2, utilizando dos mdi diferentes (1 y 10). Se muestra la amplificación del genoma viral (izquierda) y de cada uno de los minigenomas (derecha). TGEV, infección en ausencia de minigenoma.

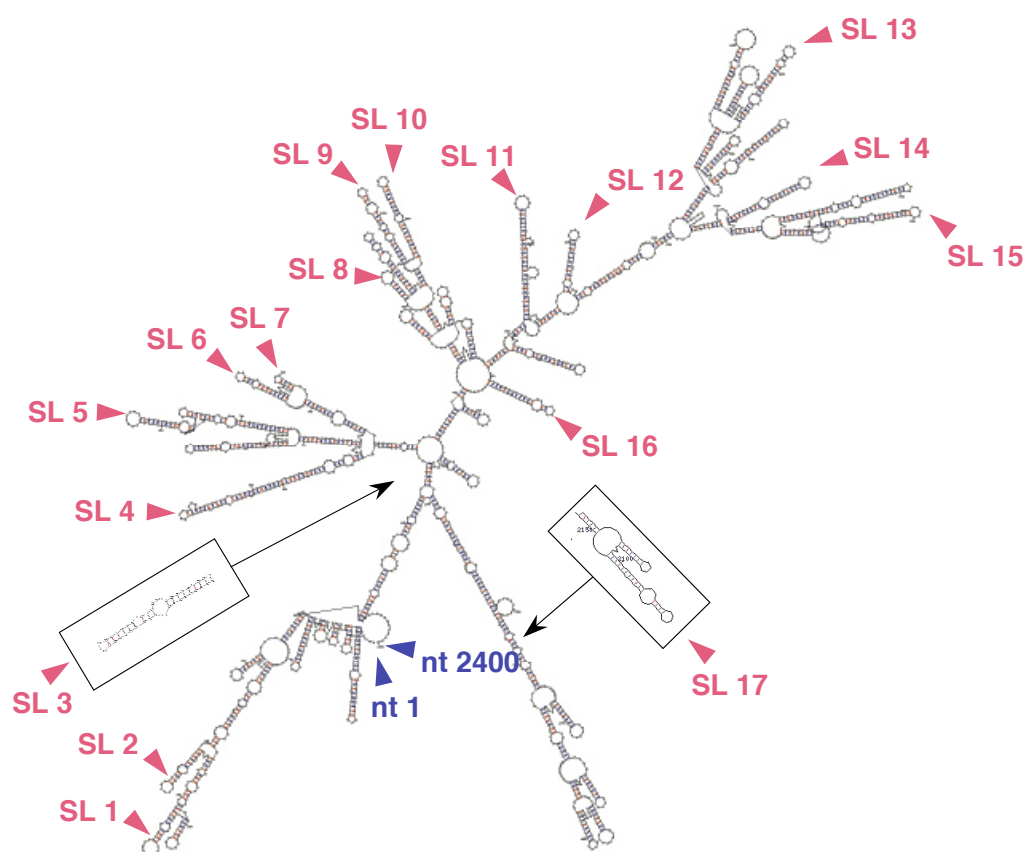
### 3.2. LOCALIZACIÓN DE DOMINIOS CONCRETOS, EN EL EXTREMO 5' DEL MINIGENOMA M26, IMPLICADOS EN EL RESCATE DE GENOMAS DEFECTIVOS

#### 3.2.1. GENERACIÓN DE MINIGENOMAS CON ESTRUCTURAS EN HORQUILLA DELECIONADAS

Los minigenomas analizados hasta ahora presentaban grandes deleciones en su secuencia 5' respecto al minigenoma M26 (desde 250 nt hasta 1.5 kb) que, en general, comprometían en todos los casos su rescate eficiente (no se redujo la secuencia de ningún genoma defectivo sin afectar la eficiencia de su rescate). Por ello, se propuso la localización de dominios estructurales de tamaño reducido que actuaran como con señales en *cis* para el rescate de genomas defectivos complementados con el TGEV, situados dentro del extremo 5' del minigenoma M26. Para estos estudios se generaron deleciones más cortas (30-50 nt)



a lo largo de los 2144 nt del extremo 5', exceptuando la zona del líder, donde se habían descrito señales de replicación (Chang y col., 1994). Para seleccionar las secuencias a deletar, se realizó una predicción de estructura secundaria de la región 5' con el programa mFOLD versión 3.2 (Zuker, 2003) y se seleccionaron estructuras en horquilla (*stem loop*, abreviado SL) previstas por el programa para su deleta (Fig. 19). Para realizar estas predicciones se tuvo en cuenta que el número de posibles estructuras previstas por el programa aumentan exponencialmente con la longitud de la molécula, y que los métodos termodinámicos dan predicciones de estructura más fiables para secuencias cortas. En efecto, para secuencias de 50, 100 ó 200 nt las estructuras previstas suelen ser correctas en un 90%, 80% y 55%, respectivamente (Higgs, 2000). Se predijo la estructura secundaria del



**Figura 19. Estructura secundaria prevista por el programa mFOLD para el RNA del extremo 5' del TGEV.** Se predijo la estructura secundaria del RNA de los primeros 2400 nt del extremo 5' del TGEV, que incluían los 2144 nt de la región 5' del minigenoma M26. Los nucleótidos 1 y 2400 se indican en azul. Las estructuras en horquilla indicadas con flechas rojas se denominaron SL1 SL17 y se deletaron secuencialmente del minigenoma M26. Las estructuras SL 3 y SL 17 (en un recuadro) no aparecen en la predicción de estructura secundaria de los 2400 nt del extremo 5' pero sí en predicciones parciales de 400 o 100 nt. SL, *stem loop*.

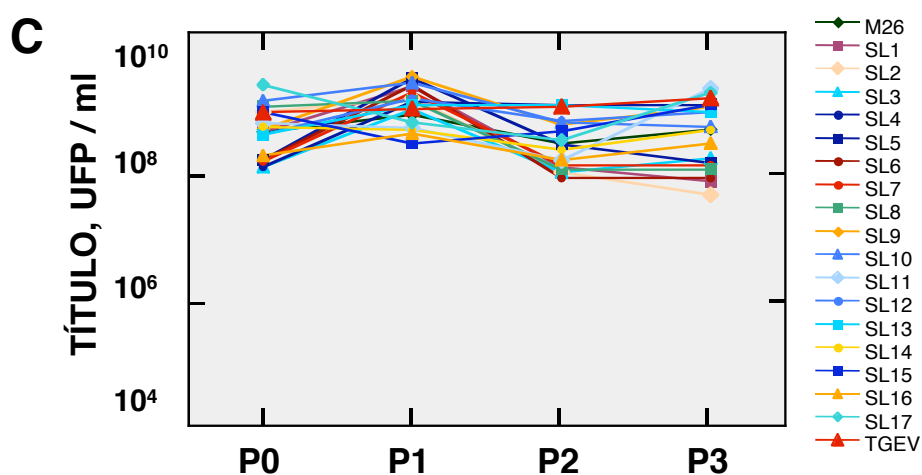
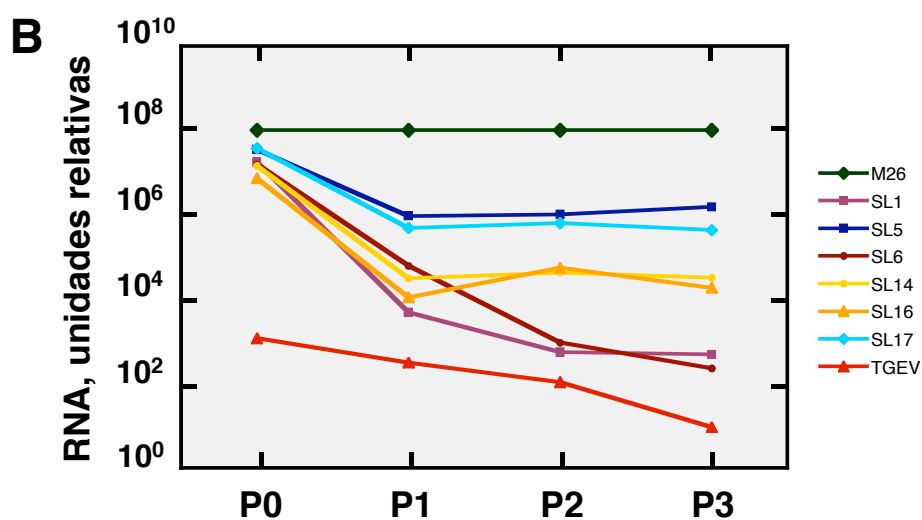
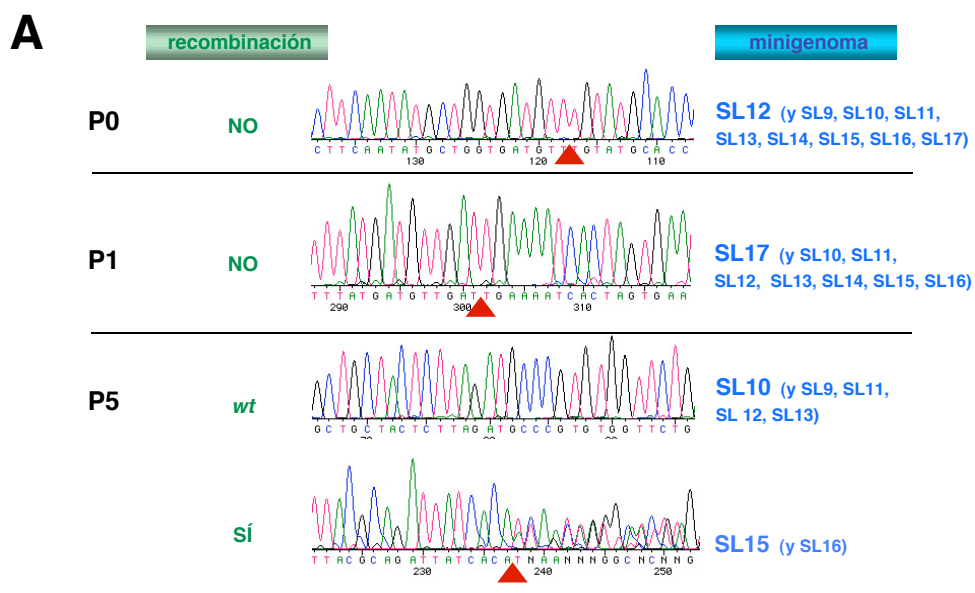
extremo 5' completo del minigenoma M26 y, posteriormente, se realizaron predicciones de secuencias de 400 nt, con 200 nt solapando entre dos secuencias consecutivas de 400 nt (Fig. 19). De esta manera se seleccionaron algunos de los motivos en horquilla que se predijeron cuando se utilizó la longitud completa del genoma del virus, para estudiar el efecto de su delección en el rescate del minigenoma. Posteriormente se comprobó que las horquillas previstas cuando se utilizaron secuencias de 400 nt también se predecían cuando se consideraron secuencias cortas (50-100 nt).

En colaboración con J. Reguera se generaron un total de 17 minigenomas mutantes de delección de estructuras identificadas con el programa mFOLD, distribuidas a lo largo del extremo 5' del minigenoma M26. Los genomas defectivos se denominaron con la posición de la horquilla delecionada, desde la zona 5' a la 3' (SL1 a SL17). Los nucleótidos delecionados se muestran en la Tabla 5 de *Materiales y Métodos*.

### 3.2.2. RESCATE DE MINIGENOMAS EN LOS QUE SE HAN DELECIONADO DOMINIOS DE ESTRUCTURA SECUNDARIA DEFINIDOS

Se transfectaron células ST con los minigenomas generados, en los que se habían delecionado horquillas de RNA específicas y se infectaron con el virus complementador PUR46-MAD. Los sobrenadantes de pase P0 obtenidos se pasaron cinco veces en nuevos cultivos de células ST y, en cada pase, se analizó el RNA de células infectadas por RT-PCR

**Figura 20. Rescate en *trans* de los minigenomas en los que se han delecionado motivos de estructura secundaria (SL1 a SL17).** (A) Cromatograma de la secuenciación de los minigenomas en los pases P0, P1 y P5. Se indica a la izquierda la existencia o no de eventos de recombinación. Se muestra un cromatograma representativo de cada caso y, entre paréntesis, se indican los minigenomas con el mismo comportamiento. La flecha roja indica la posición de la delección. *wt*, cromatograma donde sólo se observan especies revertientes, que han recuperado los nt delecionados. En los minigenomas que han sufrido recombinaciones, a partir de la posición de la delección se observa más de una población de secuencias. (B) Análisis por RT-PCR cuantitativa del rescate de los minigenomas por el virus complementador en los pases P0 a P3. Los niveles de RNA de cada minigenoma se normalizaron respecto al del genoma defectivo M26. En tonos azules se indica una eficiencia de rescate, aproximadamente, 100 veces inferior a la del minigenoma M26; en naranja, 1000 veces inferior y en tonos rojos, valores que corresponden al fondo de la técnica. TGEV, infección en ausencia de minigenoma. Se representan los valores de RNA de dos minigenomas representativos en cada caso. El resultado se reprodujo en tres experimentos independientes. (C) Título viral de los sobrenadantes de cada pase.



en tiempo real, como se había realizado previamente en el apartado 3.1.4. El análisis por RT-PCR cuantitativa de los RNAs rescatados detectó una caída inicial de los niveles del RNA de los minigenomas con deleciones (pases P1-P2) y una posterior recuperación de dichos niveles para la mayoría de los minigenomas a partir del pase P3-P4, siendo el aumento de replicación de estos minigenomas más claro en pase P5 (resultados no mostrados), donde gran parte de los minigenomas recuperaban los niveles de RNA observados inmediatamente después de la transfección y se igualaban a los valores del genoma defectivo M26. La secuenciación de los RNAs de pase P5 reveló una alta frecuencia de recombinación en todos los minigenomas que habían restablecido su rescate, habiendo recuperado gracias a este proceso la región delecionada (Fig. 20A). Los minigenomas que se amplificaron 1000 veces por debajo del nivel del M26 no se pudieron secuenciar. Probablemente, debido a sus bajos niveles de rescate, no habían recombinado, en contraste con lo ocurrido con los minigenomas que habían recuperado la zona delecionada.

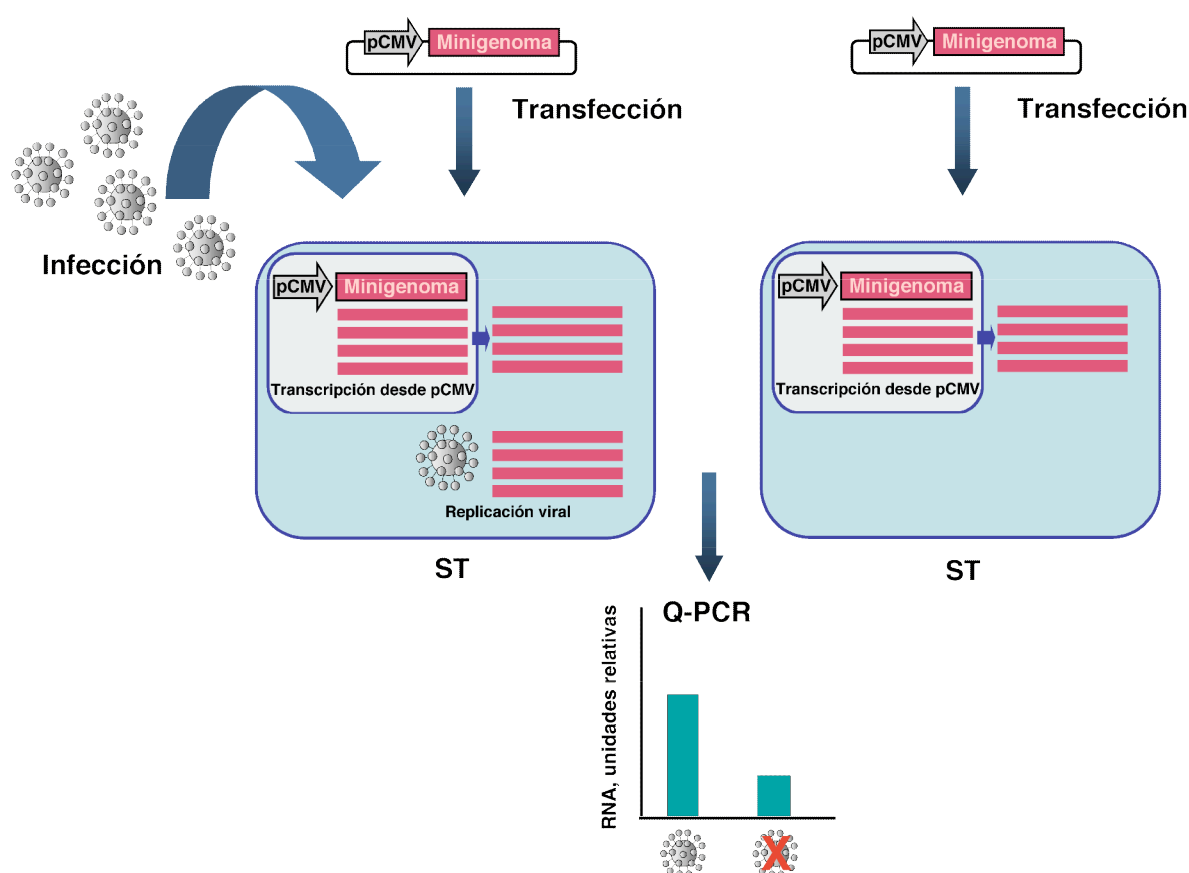
La recombinación observada entre los minigenomas y el virus complementador anulaba el significado de la cuantificación del rescate de los genomas defectivos en pase P5 por lo que, en esta evaluación, sólo se tuvieron en cuenta los datos obtenidos hasta los pases P2-P3, que se identificó como el punto de inflexión en la síntesis de RNA de algunos minigenomas, al aumentar los valores debido a la imposición de genomas revertientes por recombinación entre el minigenoma defectivo y el virus complementador (Fig. 20B). Si bien ninguno de los minigenomas se rescató en los pases bajos con la misma eficiencia que el minigenoma parental M26, los minigenomas con deleciones en horquillas de RNA podían agruparse en tres conjuntos, que se rescataron con un nivel de síntesis de RNA de, aproximadamente, 100 (SL3 a SL5, SL8, SL10 a SL13, SL15 y SL17), 1000 (SL9, SL14, SL16) ó 10000 (SL1, SL2, SL6 y SL7) veces por debajo de los niveles del genoma M26. Por tanto, la secuencia del extremo 5' del RNA de los minigenomas parecía ser necesaria en su conjunto para el rescate eficiente. Ello podía deberse a que a lo largo del mismo había señales en *cis* necesarias para el rescate o a la necesidad de las secuencias delecionadas para un plegamiento correcto de la estructura secundaria del RNA. Esta interpretación se reforzaría por la observación de que en algunos genomas defectivos (como el SL14 y el SL16) el efecto de la deleción en el rescate es más acusada como consecuencia de pequeñas deleciones en el extremo 5' que cuando se delecionan mayores dominios en la misma posición, tal como se observó para el minigenoma M19. Los sobrenadantes de cada pase se

titularon para comprobar que en todos los casos el virus complementador alcanzó títulos adecuados para el rescate, es decir, superiores a  $10^7$  UFP/ml (Fig. 20C).

### 3.3. DIFERENCIACIÓN ENTRE REPLICACIÓN Y ENCAPSIDACIÓN DE GENOMAS DEFECTIVOS.

#### 3.3.1. OPTIMIZACIÓN DE UN ENSAYO DE REPLICACIÓN DE MINIGENOMAS EN PASE P0

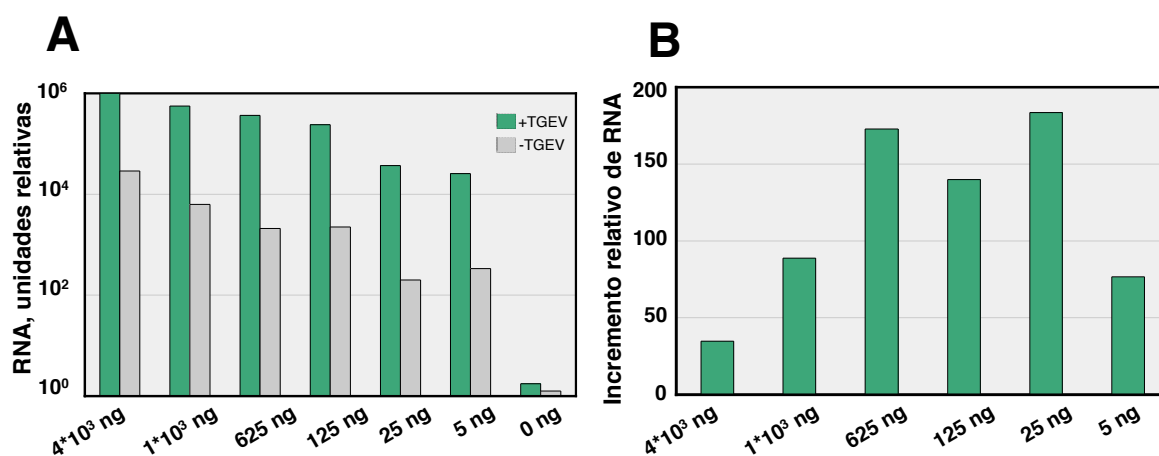
El análisis del rescate en *trans* de minigenomas aportaba información sobre las secuencias requeridas para la encapsidación y la replicación viral. En los resultados de



**Figura 21. Esquema de un ensayo de replicación de minigenomas en fase P0.** Este ensayo determina por RT-PCR cuantitativa (Q-PCR) si existe incremento de los niveles de RNA de un minigenoma en presencia del virus complementador, respecto al nivel basal de síntesis de RNA por transcripción desde el promotor de CMV. El aumento de los niveles de RNA del minigenoma estaría causado por la replicación de la molécula por el virus complementador debido a la existencia en su secuencia de señales de replicación reconocidas por la polimerasa viral. pCMV, promotor de citomegalovirus.

rescate ineficiente de minigenomas era conveniente discernir entre los requerimientos para replicación y encapsidación. El estudio separado de la replicación y de la encapsidación requería trabajar en pase P0, puesto que, por ejemplo, minigenomas con una baja eficiencia de replicación, sin tener afectada la encapsidación, se perderían con los pases, por lo que el estudio de la encapsidación no sería viable en pases posteriores. Análogamente, minigenomas con ineficiente encapsidación, aún teniendo intactas las señales de replicación, también se perderían después de varios pases en cultivos.

Se decidió optimizar un ensayo de evaluación de la replicación de minigenomas en pase P0, en primer lugar, puesto que la replicación constituye un paso previo a la encapsidación en el ciclo viral que condiciona los niveles iniciales de cada especie de RNA, genómico o subgenómico. El objetivo del ensayo sería determinar si los niveles de un minigenoma que se transcribe desde el promotor de CMV por la RNA *pol* II celular sufren un segundo ciclo de amplificación por la replicasa del virus complementador (Fig. 21). Es decir, se trataría de detectar en qué casos la cantidad de RNA de un genoma defectivo aumenta, respecto a los niveles basales de transcripción por la *pol* II, cuando este RNA es amplificado por la



**Figura 22. Sensibilidad de un ensayo de replicación de minigenomas en pase P0.** (A) Análisis por RT-PCR cuantitativa de los niveles relativos del RNA del minigenoma M26 transcrito por la *pol* II celular, en presencia y ausencia de virus complementador. En la parte inferior de cada gráfica se indica la cantidad de DNA del minigenoma M26 transfectada en cada caso. +TGEV y -TGEV, células transfectadas con el minigenoma M26 en presencia o ausencia del virus complementador, respectivamente. (B) El incremento en los niveles de RNA del minigenoma se determinó como el cociente entre los niveles de RNA en presencia y ausencia del virus complementador.

maquinaria viral. El cálculo de este incremento indicaría los niveles de replicación.

Con el fin de optimizar la evaluación de los niveles de RNA, células ST se transfectaron con cantidades decrecientes de plásmido (desde 4  $\mu$ g hasta 5 ng) expresando el minigenoma M26 bajo el promotor de CMV y, posteriormente, se infectaron con el virus PUR46-MAD con una mdi de 10. A las 16 hpi se extrajeron los RNAs de las células infectadas y se digirieron con DNAsa para eliminar restos de plásmido transfectado que pudieran ser detectados en la reacción de PCR. Los RNAs se analizaron por RT-PCR en tiempo real, comparándose los niveles de RNA en las células que únicamente habían sido transfectadas con los de las células transfectadas e infectadas con el virus complementador (Fig. 22A). Los resultados mostraron que en todas las concentraciones de DNA utilizadas se producía un aumento de los niveles de RNA del minigenoma M26 en presencia de infección por el TGEV. Se seleccionó la transfección con 625 ng de plásmido porque mostraba una de las mayores diferencias entre los niveles de RNA producido en presencia y en ausencia del virus complementador, probablemente debido a que con concentraciones mayores de DNA se producía la saturación del sistema (Fig. 22B).

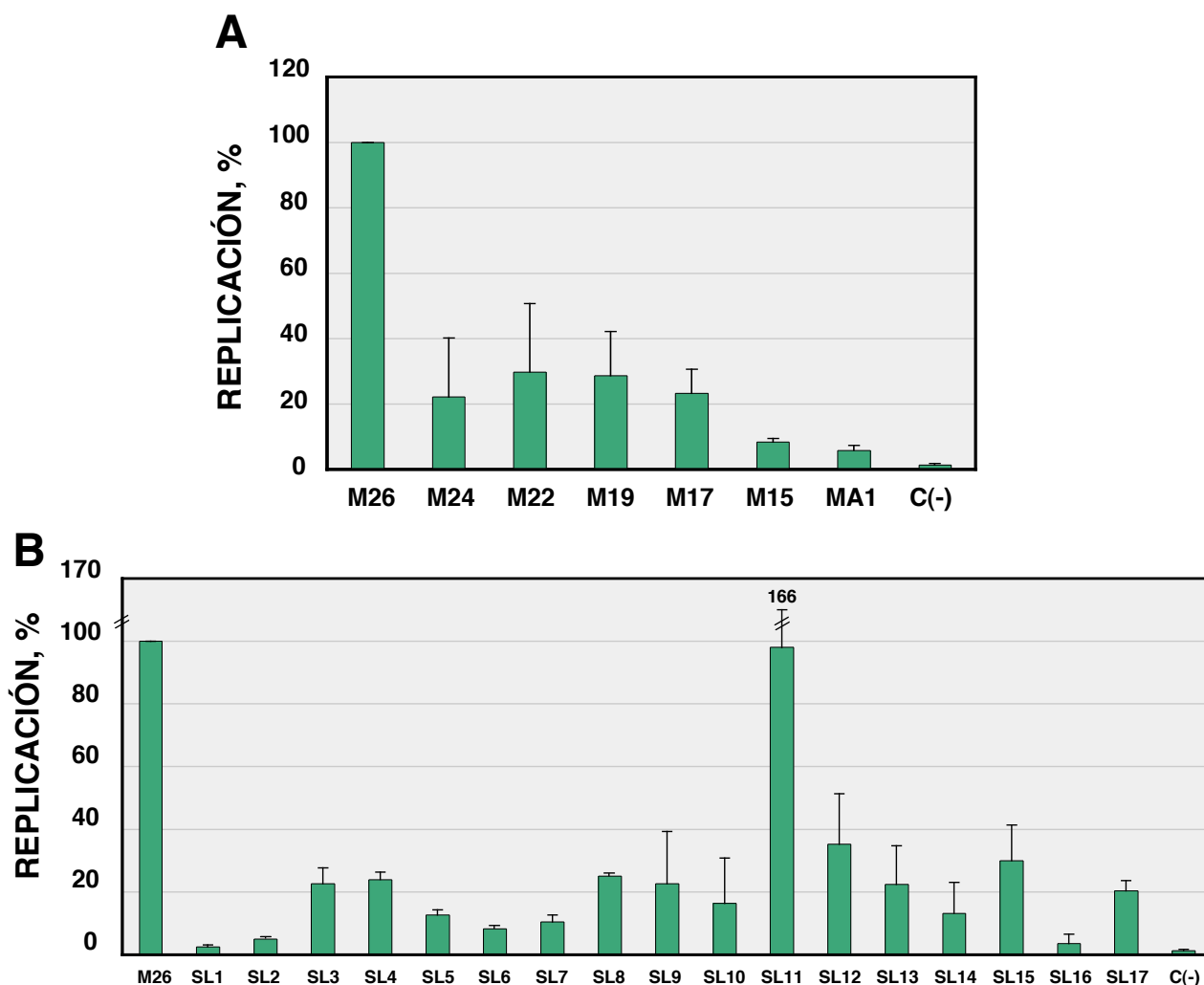
### **3.3.2. ESTUDIO DE LOS NIVELES DE REPLICACIÓN DE LOS GENOMAS DEFECTIVOS: INFLUENCIA DE LA DELECCIÓN PROGRESIVA DEL EXTREMO 5' Y DE ESTRUCTURAS EN HORQUILLA**

Se analizó la replicación de los minigenomas delecionados progresivamente en el extremo 5' (M24 a M15), como se ha descrito en el apartado anterior, en colaboración con J. Reguera. El plásmido que codificaba cada genoma defectivo se transfectó (625 ng por placa conteniendo  $10^6$  células) y los niveles de RNA transcritos por la RNA *pol* II se compararon con los obtenidos cuando, además de la transfección del minigenoma, las células se infectaron con el virus PUR46-MAD a una mdi de 10. La replicación se expresó como un porcentaje del incremento del nivel de RNA de cada minigenoma en presencia del virus complementador respecto al incremento que experimentó el RNA del minigenoma M26 en las mismas condiciones. A este nivel se le asignó arbitrariamente un valor de 100% (Fig. 23). Todos los minigenomas analizados aumentaron sus niveles de RNA en presencia del virus complementador o, lo que es lo mismo, todos replicaron, aunque ninguno lo hizo con la misma eficiencia que M26 (aproximadamente un 20-25% respecto a la replicación del genoma defectivo M26), a excepción de los minigenomas M15 y MA1, que sólo replicaban entre un 5 y un 10%. El control negativo del experimento, el plásmido pcDNA3

## resultados

expresando la proteína eGFP, no aumentó sus niveles de RNA en las células infectadas respecto a las transfectadas (Fig. 23A).

La eficiencia de replicación también se calculó para los minigenomas delecionados en estructuras secundarias previstas por el programa mFOLD, en los que en pase P0 no se había detectado la reversión de secuencia descrita en el apartado 3.2.2. En este análisis



**Figura 23. Evaluación de los niveles de replicación de los minigenomas.** (A) Se representan los niveles de replicación de los minigenomas derivados de M26 delecionados en el extremo 5', respecto al genoma defectivo M26, al que se asigna un valor arbitrario de replicación del 100%. Este valor hace referencia al incremento en los niveles de RNA del minigenoma en presencia del virus complementador. Las barras indican la desviación estándar de tres experimentos independientes. (B) Se muestra la replicación de los minigenomas a los que se les ha delecionado las horquillas de RNA (SL1 a SL17) indicadas en ordenadas, con su desviación estándar. Se representa el promedio de tres experimentos independientes. C-, replicación de un RNA no viral (eGFP) en presencia del virus complementador.



tampoco se encontró ningún minigenoma que replicara igual que el parental M26. Los minigenomas con deleciones más alejadas del extremo 5' (SL8 a SL17) replicaban un 20% respecto al RNA M26, a excepción de SL16 que, junto con la mayoría de los minigenomas con deleciones cercanas a la secuencia líder (SL1 a SL 2 y SL5 a SL7) se amplificó muy ineficientemente (Fig. 23B). Los valores de replicación del minigenoma SL11, similares a los del genoma defectivo M26, no parecían significativos por su elevada desviación estándar.

Los resultados de replicación correlacionan muy bien con los obtenidos en los experimentos de rescate, puesto que se requiere de la integridad del extremo 5' del minigenoma M26 para una replicación eficiente y, además, parece existir un punto de inflexión entre la replicación de los minigenomas M17 y M15 (los niveles de replicación caen drásticamente de uno a otro). Esto sugiere que los resultados de rescate, al deleccionar determinadas secuencias, están fundamentalmente influenciados por la alteración de la replicación y no de la encapsidación.

### **3.4. LOCALIZACIÓN DE LA SEÑAL DE ENCAPSIDACIÓN EN EL VIRUS TGEV**

#### **3.4.1. SECUENCIAS DE RNA QUE FACILITAN LA ENCAPSIDACIÓN EN EL TGEV**

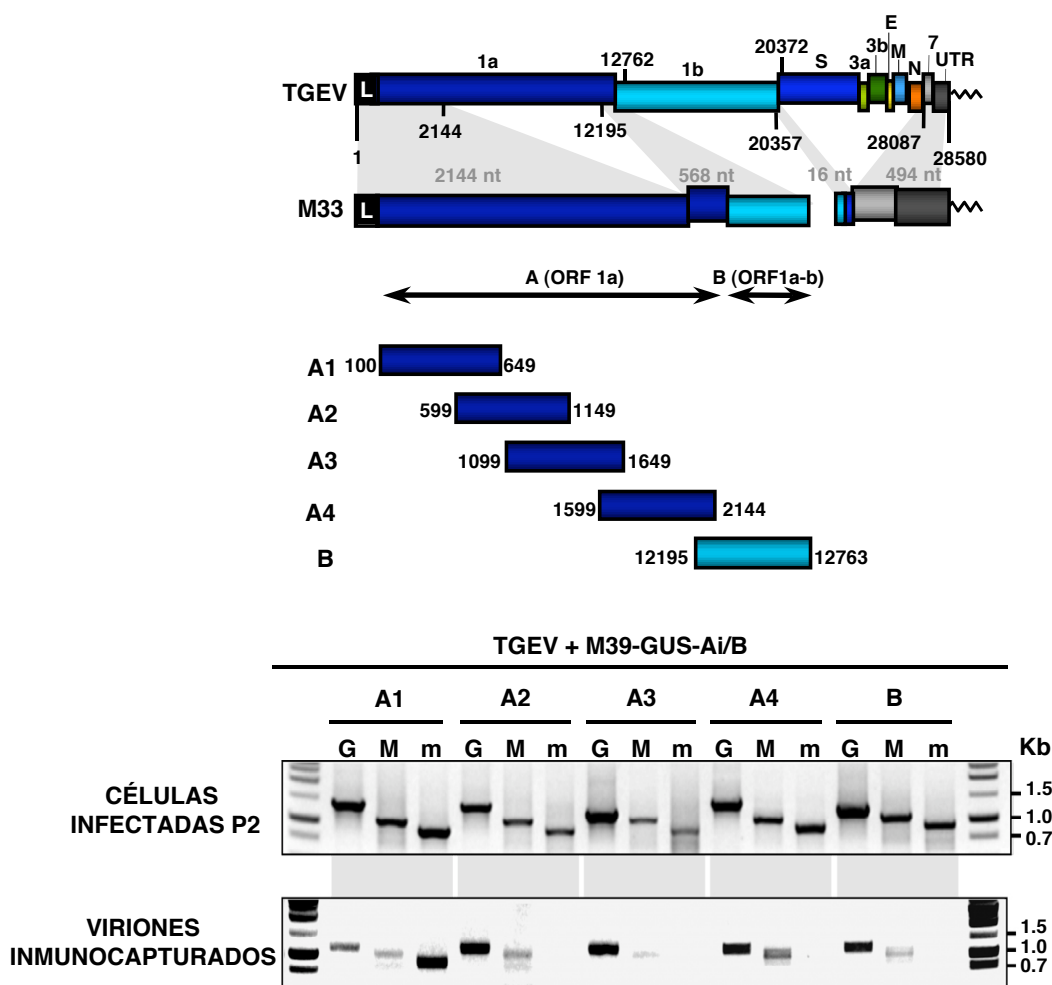
En el TGEV la localización de la señal de encapsidación se había iniciado con el estudio de minigenomas sintéticos derivados del mismo (Izeta y col., 1999). Los minigenomas rescatados en cultivos celulares por un virus complementador contenían las secuencias mínimas necesarias para la replicación y la encapsidación. Cuando se iniciaron estos estudios, el minigenoma más pequeño con eficiente rescate era M33, por lo que se utilizó como punto de partida para localizar la señal de encapsidación en TGEV, en colaboración con D. Escors.

El extremo 5' del genoma defectivo M33 procedía de dos zonas discontinuas del genoma del virus, A y B, que se localizaban en los primeros 2144 nt del virus y en los 568 nt de la región solapante entre los genes 1a y 1b (nt 12195 a 12763), respectivamente. La región A se subdividió en cuatro fragmentos, denominados A1, A2, A3 y A4, de aproximadamente 550 nt cada uno, que solapaban entre sí en 50 nt (Fig. 24A). Cada una de estas secuencias, además de la región B, se clonó en el minigenoma M39-GUS, en la región

5' del gen GUS, bajo el control de una TRS viral optimizada derivada del gen N. Así, el minigenoma M39-GUS incluye una unidad transcripcional que da lugar a un sgRNA formado por las secuencias derivadas del minigenoma M33 (A1-4 y B) unidas al gen trazador GUS (mRNA-Ai/B). Este genoma defectivo es rescatado eficientemente en cultivos celulares por un virus complementador.

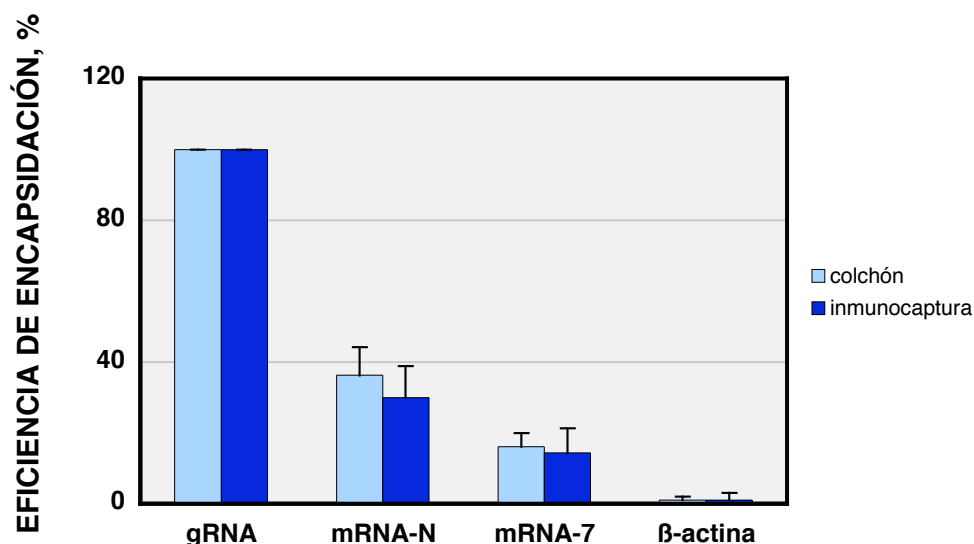
El estudio de la encapsidación de RNAs en viriones requería un método de purificación de virus que discriminara RNAs encapsidados de RNAs contaminantes no encapsidados, virales o celulares. Después de comparar diferentes metodologías de purificación de viriones, se eligió la inmunocaptura del virus con un anticuerpo dirigido contra el extremo amino de la proteína M, expuesto en la membrana, que daba especificidad al proceso. Este protocolo fue el que mejores resultados dio, de todos los ensayados y el que requería de una menor cantidad de material de partida (resultados no mostrados). Para la inmunopurificación, el virus se concentraba previamente en un colchón de sacarosa al 15%. Posteriormente se unía al anticuerpo específico y finalmente se realizaba una serie de 10 lavados con Tween 20 al 0.5%. Cuando se purificaban viriones según la metodología descrita, únicamente se detectaba el gRNA en los viriones por RT-PCR convencional pero no RNAs virales subgenómicos o RNAs celulares como el de la  $\beta$ -actina (resultados no mostrados). Una vez validado este método, se utilizó para estudiar la encapsidación en viriones de los mRNAs subgenómicos mRNA-Ai/B transcritos por el minigenoma M39.

En experimentos de rescate de minigenomas hasta pase P2, se estudió la presencia o ausencia del genoma, minigenoma M39 y mRNA-Ai/B, tanto en el RNA de células infectadas como en viriones inmunopurificados. Independientemente de la secuencia introducida en los minigenomas, el genoma, los minigenomas y sus mRNAs se detectaron en las células infectadas. Sin embargo, en los viriones purificados a partir de células infectadas, sólo se detectó el mRNA del gen GUS conteniendo la región A1, que incluía la secuencia líder y los 550 nt que van a continuación (Fig. 24B). En contraste, en el resto de las células transfectadas con minigenomas que incluyeron los fragmentos A2, A3, A4 y B, se detectó el genoma el minigenoma M39, pero no el mRNA. La secuenciación del producto de RT-PCR que amplificaba el mRNA-A1 indicó que el fragmento había perdido una diana de clonaje *Sal* I, situada entre el líder y el fragmento A1, de forma que se restauraba la continuidad líder-extremo 5' que existe en el genoma viral. De los resultados se dedujo que debía existir una señal de encapsidación dentro de los 649 primeros nucleótidos del genoma del TGEV, que incluyen el líder.



**Figura 24. Localización de secuencias en *cis* requeridas para la encapsidación del genoma del TGEV.** (A) Esquema del minigenoma M33, indicando las regiones en las que se subdividió y su procedencia (sombreado) dentro del genoma del TGEV. Las regiones A (derivada de la ORF 1a) y B (ORF 1ab) se subdividieron en cinco fragmentos que se clonaron en el minigenoma M39, precedidas de la TRS del gen N, de forma que se transcribía un mRNA subgenómico que contenía las secuencias potencialmente responsables de la encapsidación en el TGEV. Los números indican posiciones del genoma del TGEV. (B) Análisis por RT-PCR de la presencia de RNAs de origen viral en células infectadas (P2) y en viriones inmunocapturados. G, genoma viral; M, minigenoma M39; m, mRNA-Ai/B; M39-GUS-Ai/B, minigenoma M39 que incluye los fragmentos A1, A2, A3, A4 y B derivados del minigenoma M33 bajo las TRSs del gen N.

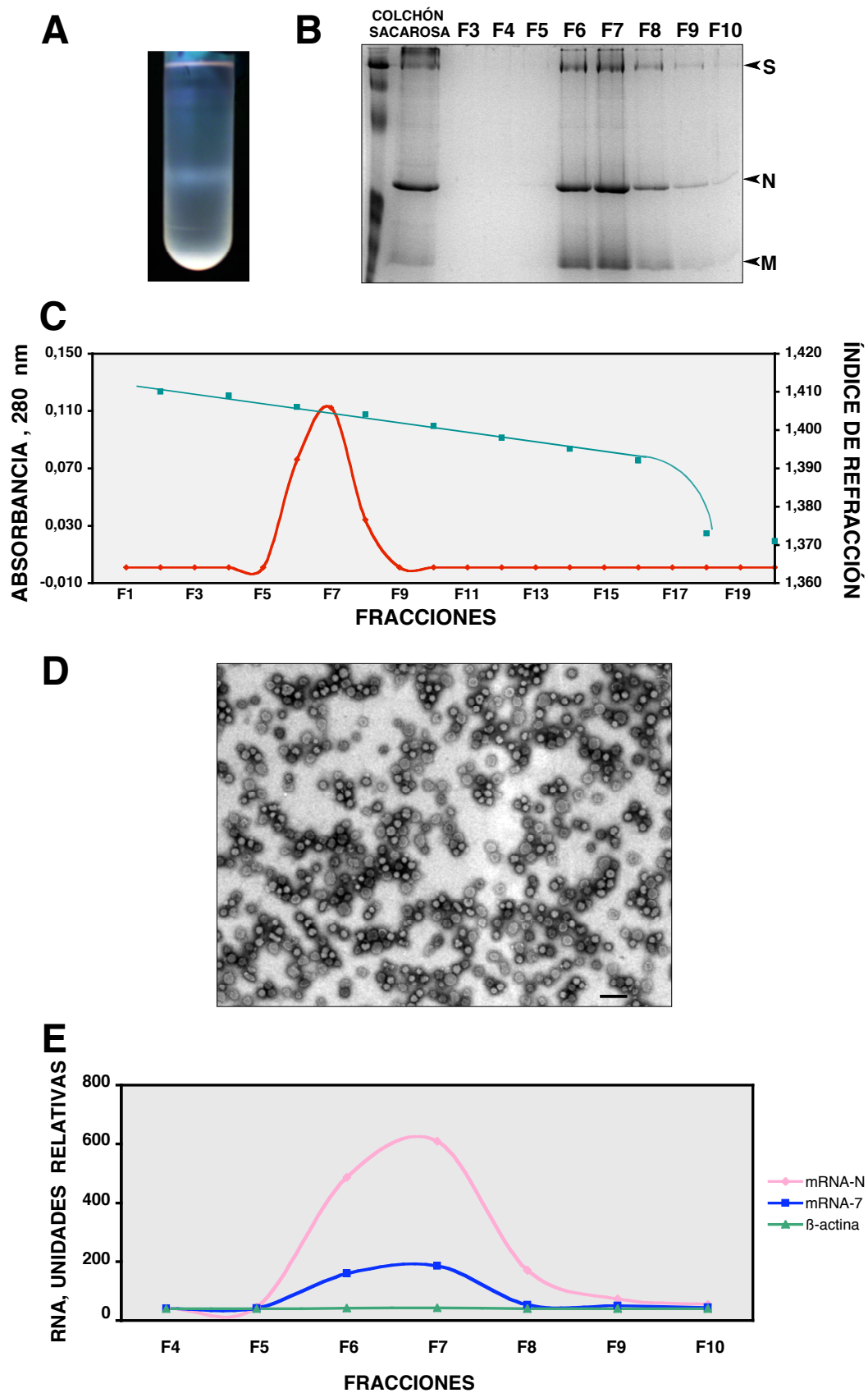
### 3.4.2. ESTUDIO CUANTITATIVO DE RNAs ENCAPSIDADOS EN VIRIONES PURIFICADOS



**Figura 25. Evaluación de la eficiencia de encapsidación de RNAs en viriones purificados en colchón de sacarosa y en inmunocaptura.** Resultado del análisis por RT-PCR en tiempo real de la eficiencia de encapsidación de RNAs virales (mRNA-N y mRNA-7) y celulares (β-actina), calculada respecto al RNA genómico viral (gRNA) mediante dos tipos de purificaciones (colchón de sacarosa e inmunocaptura). Se muestra el promedio de tres experimentos independientes con la desviación estándar correspondiente.

En las preparaciones obtenidas mediante el protocolo de inmunocaptura descrito en el apartado anterior, los análisis de los viriones por RT-PCR convencional sólo detectaron el gRNA pero no sgRNAs subgenómicos virales o celulares (β-actina) analizados. Utilizando el protocolo de inmunopurificación de viriones, se obtuvieron preparaciones virales y se

**Figura 26. Purificación de viriones del TGEV en gradiente continuo de sacarosa.** (A) Migración de los viriones del TGEV, en un gradiente continuo de sacarosa del 30-43%, hasta alcanzar la densidad de 1.20 g/ml. En esta posición se observa una banda blanca correspondiente a la acumulación de partículas virales. (B) Análisis de las fracciones (1.5 ml) del gradiente por electroforesis en gel de acrilamida teñido con azul de Coomassie para detectar las proteínas virales. En la figura se muestra el análisis de las fracciones 3 a 10 (F3 a F10) y el virus purificado a través de un colchón de sacarosa al 31%, correspondiente al material de partida para la purificación en el gradiente continuo de sacarosa. S, proteína S; M, proteína M; N, proteína N. (C) Análisis del índice de refracción y la absorbancia a 280 nm de todas las fracciones recogidas del gradiente. El máximo de absorbancia a 280 nm se localizó en la fracción 7, correspondiente a la máxima concentración de proteínas. (D) Análisis por microscopía electrónica de tinción negativa de las fracciones 6 a 8. La barra se corresponde con una longitud de 200 nm. (E) Análisis por RT-PCR cuantitativa del mRNA-N, mRNA-7 y el mRNA celular de la β-actina presentes en las fracciones 4 a 10.



## **resultados**

analizaron por una técnica más sensible, como la RT-PCR en tiempo real. En este caso apenas se detectó la encapsidación de mRNAs celulares ( $\beta$ -actina) o virales, tales como el mRNA-7, el segundo sgRNA viral por orden abundancia. Sin embargo, el mRNA-N, el más abundante en la célula infectada, se detectó en el virión con una eficiencia de encapsidación variable en distintos experimentos, pero que podía alcanzar un 30% respecto a la obtenida por el genoma (Fig. 25). Los mismos resultados se obtuvieron cuando los virus se purificaron parcialmente en un colchón de sacarosa al 15%, el paso previo en el proceso de inmunopurificación (Fig. 25). La eficiencia de encapsidación se calculó respecto al genoma, según la fórmula descrita en el apartado 2.7.5.1. de *Materiales y Métodos*.

Para descartar que los RNAs diferentes al genoma viral (fundamentalmente mRNA-N) detectados por RT-PCR cuantitativa en viriones inmunopurificados fueran contaminantes, se realizaron estos estudios utilizando preparaciones de virus purificados siguiendo un protocolo más elaborado. La purificación mejor caracterizada del TGEV se realiza en un gradiente continuo de sacarosa al 30-43% y fue descrita previamente (Méndez y col., 1996). En este gradiente el virus migra por ultracentrifugación hasta la fracción del gradiente con una densidad de 1.20 g/ml, correspondiente a una concentración de sacarosa del 39% aproximadamente (Fig. 26A). Para analizar la presencia de RNAs en los viriones del TGEV se realizó una purificación en un gradiente continuo de sacarosa al 30-43%, en colaboración con J. Reguera, según el protocolo indicado en *Materiales y Métodos*. Las fracciones recogidas de los gradientes se analizaron por tinción de los geles de poliacrilamida con azul de *Coomasie* (Fig. 26B). El contenido en proteína se determinó por absorbancia a 280 nm (Fig. 26C). Las proteínas del virus se localizaron en las fracciones 6 a 8 por ambos procedimientos, por lo que estas fracciones debían contener el virus purificado. Las fracciones que incluían el virus fueron analizadas por microscopía electrónica de tinción negativa para confirmar la pureza de la preparación (Fig. 26D). Las micrografías mostraron una preparación homogénea de viriones, no encontrándose vesículas o estructuras derivadas de membranas que pudieran incluir RNAs o ribonucleoproteínas.

El RNA de los viriones de las fracciones 6 a 8 se extrajo y se analizó la presencia de RNAs virales (mRNA-N y mRNA-7) y RNAs celulares ( $\beta$ -actina) por RT-PCR cuantitativa. La banda de mayor abundancia de cada uno de los RNAs coincidió con el de las fracciones que contenían el virus, indicando que estos RNAs migraban en el gradiente con el virus (Fig. 26E). Los RNAs del gen 7 y la  $\beta$ -actina fueron menos abundantes que el

mRNA-N (el más abundante en la célula infectada, como se ha mencionado anteriormente). Los viriones purificados se trataron con RNAsa A para digerir los RNAs no encapsidados, pero este tratamiento no varió los resultados (resultados no mostrados). Por tanto, los RNAs detectados, diferentes al genoma, estaban protegidos y asociados a los viriones. El hecho de que la presencia de estos RNAs en virus purificados sea proporcional a la abundancia de dichos RNAs en la célula, sugiere que su incorporación en los viriones no es específica. Además, el enriquecimiento en genoma viral es muy superior, por lo que debe existir un proceso de encapsidación activa o específica.

### **3.4.3. OPTIMIZACIÓN DE UN ENSAYO DE ENCAPSIDACIÓN DE RNAs PARA EL ANÁLISIS POR RT-PCR CUANTITATIVA**

Como se ha descrito en el apartado anterior, mediante la purificación de virus TGEV en un gradiente continuo de sacarosa se detectan RNAs diferentes al genoma en las fracciones de viriones por RT-PCR en tiempo real. Siguiendo este procedimiento se obtuvieron resultados similares a los obtenidos con protocolos de purificación menos complejos como los que se basaron en colchones de sacarosa o inmunocaptura. Asimismo, los protocolos de purificación de virus basados en gradientes continuos de sacarosa requerían la producción a gran escala de células infectadas. Este protocolo, por tanto, no era viable para analizar simultáneamente una colección de RNAs candidatos a tener señales en *cis* que faciliten su encapsidación.

Estudios previos demostraron que las partículas defectivas derivadas del TGEV atraviesan un colchón de 1.11 g/ml de densidad, correspondiente a un porcentaje de sacarosa del 15% (Méndez y col., 1996). Se decidió comparar la eficacia de dos metodologías de purificación más sencillas, la purificación del virus en un colchón de sacarosa al 15%, frente a la purificación en colchón discontinuo de sacarosa al 15-43%, analizando en cada caso la presencia en los viriones de un RNA encapsidado (genoma, minigenoma M26) y de RNAs probablemente encapsidados inespecíficamente (RNAs subgenómicos transcritos por el virus,  $\beta$ -actina). Para la realización de estos experimentos se utilizó el virus recombinante TGEV-PUR-S<sub>PTV</sub> expresando un sgRNA-R4 que no contiene señales de encapsidación (descrito en el siguiente apartado) derivado del extremo 5' del minigenoma M26, desde la posición del gen no esencial 3a/b y utilizando las TRSs de este gen.

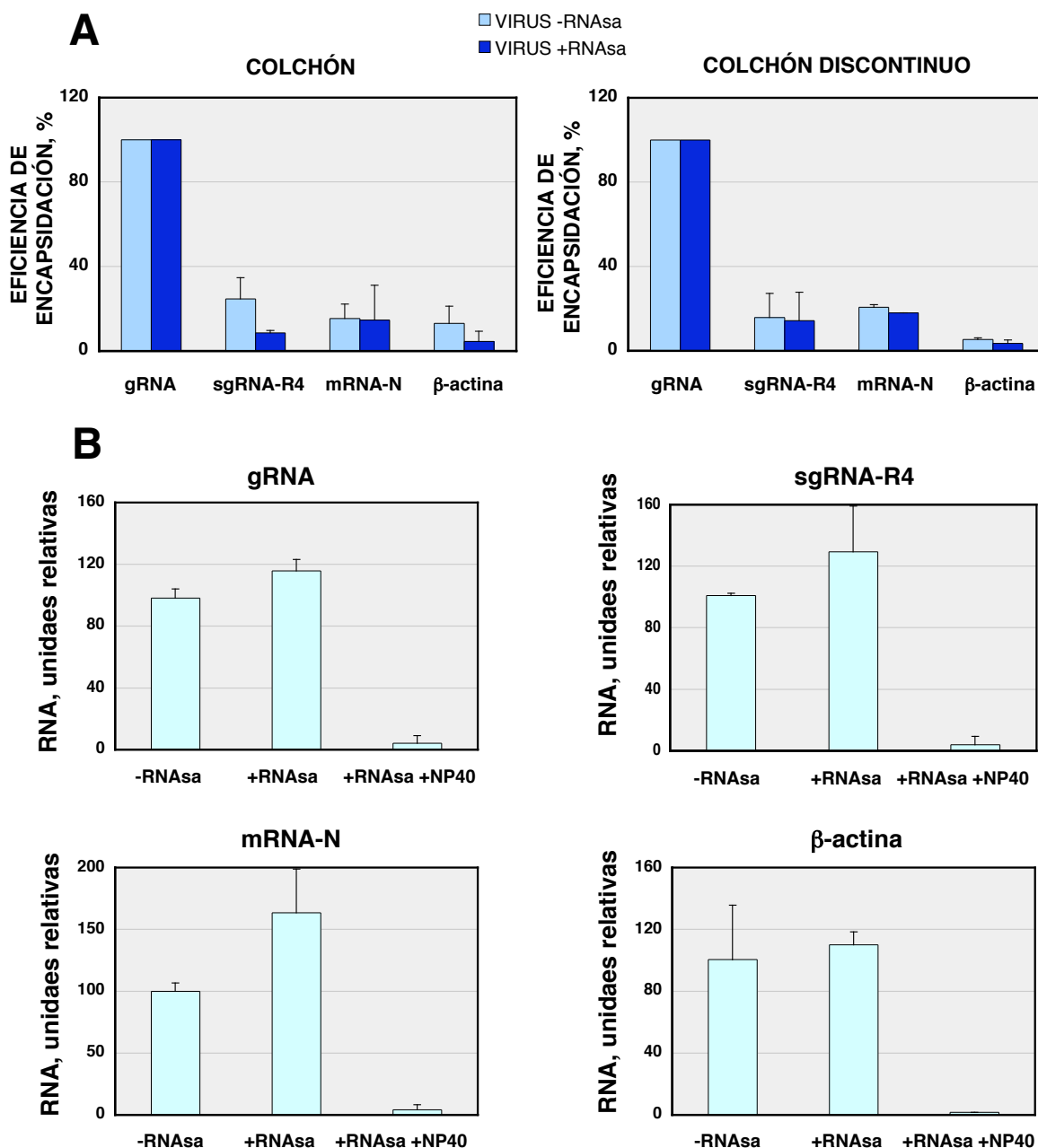
Se infectaron células ST con el virus TGEV-PUR-S<sub>PTV</sub> y los sobrenadantes de los cultivos se recogieron a las 18-20 hpi. Los restos celulares se centrifugaron y el virus se purificó parcialmente en un colchón de sacarosa al 15%, en un caso, y en un colchón discontinuo de sacarosa con densidad del 15% y 43%, en el otro. En el primer protocolo el virus sedimentado se resuspendió en el tampón TNE. En el segundo protocolo se recogió 1 ml de la interfase del colchón, y se eliminó la sacarosa mediante una nueva centrifugación. Finalmente los viriones se resuspendieron en tampón TNE. Los virus obtenidos se sonicaron en un baño para disociar los agregados y las posibles membranas lipídicas asociadas. Una fracción de la purificación viral se trató con RNAsa A, para eliminar los RNAs que no estuvieran protegidos (encapsidados), mientras que otra alícuota no se trató, utilizándose como control del experimento. En ambos procedimientos se analizó la presencia de RNAs virales (genoma, mRNA-N y sgRNA-R4) y celulares (mRNA de la  $\beta$ -actina) por RT-PCR cuantitativa.

Con los dos protocolos de purificación de virus se obtuvieron resultados similares (Fig. 27A). El sgRNA-R4 se encapsidó con una eficiencia de, aproximadamente, el 15% respecto al genoma. El mRNA-N mostró una eficiencia aparente de encapsidación en torno al 20%, proporcional a su mayor abundancia en la célula infectada. El RNA celular de la  $\beta$ -actina apenas se detectó en los viriones. Puesto que no se observaron diferencias entre las muestras con RNAsa A y sin ella, se realizó un control de degradación de la RNAsa A para confirmar que la enzima era funcional. Utilizando preparaciones de virus concentrado en un colchón de sacarosa al 15%, se liberó el RNA encapsidado por la acción de un detergente (NP-40), se confirmó que la RNAsa A degradó el RNA no protegido (Fig. 27B).

Para el análisis de la encapsidación de RNAs por RT-PCR en tiempo real se eligió la purificación parcial en un colchón de sacarosa al 15%, por ser un ensayo que implica menos pasos de manipulación de la muestra que la purificación en un colchón discontinuo y obtiene los mismos resultados. Esta misma conclusión se obtuvo al aplicar otras metodologías de purificación más complejas, como la purificación en gradiente continuo de sacarosa y la inmunocaptura, en las que, además, el rendimiento de RNA fue bajo y la cantidad resultante estaba en el límite de detección de RNA, lo que originó resultados variables cuando la cuantificación se realizó por RT-PCR cuantitativa.

#### **3.4.4. GENERACIÓN DE VIRUS RECOMBINANTES EXPRESANDO RNAs SUBGENÓMICOS DERIVADOS DEL EXTREMO 5' DEL MINIGENOMA M26**



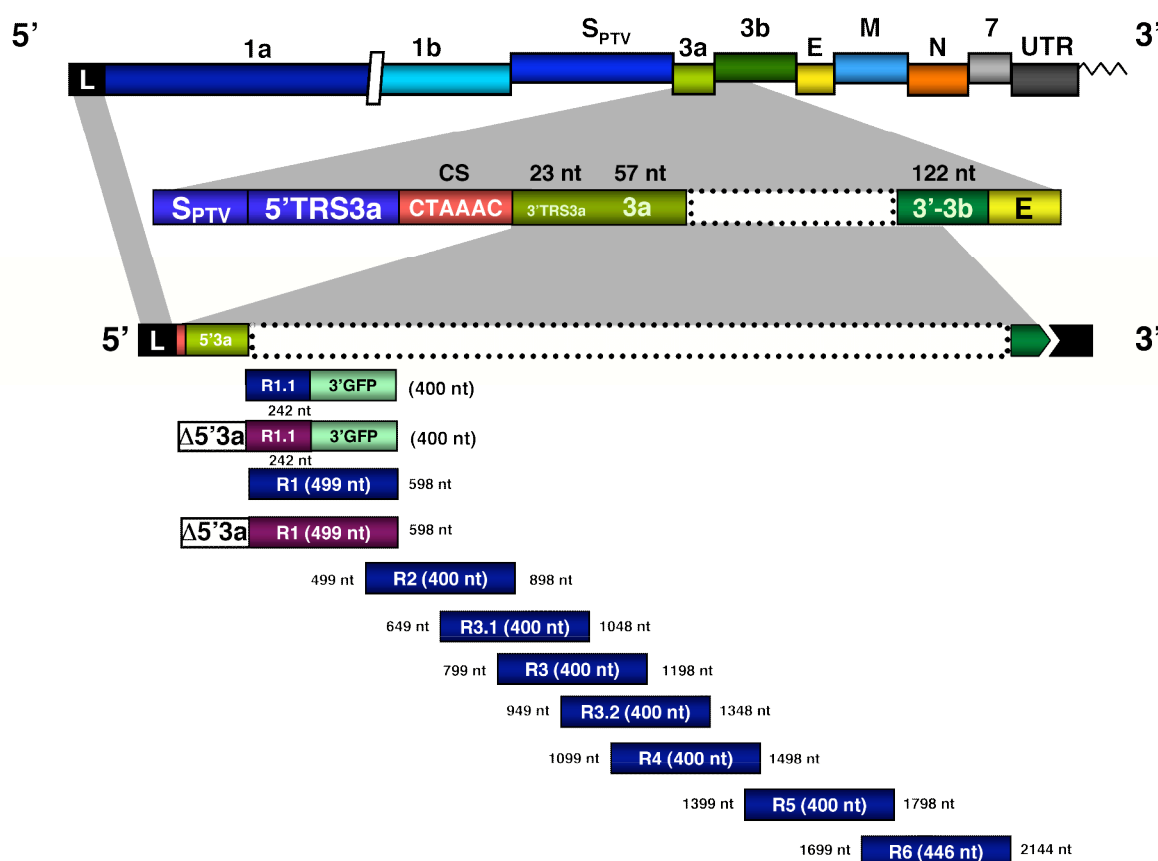


**Figura 27. Purificación de viriones en colchón y en gradiente discontinuo de sacarosa.** (A) Análisis por RT-PCR en tiempo real de los RNAs encapsidados en viriones y purificados a través del colchón de sacarosa (izquierda) o gradiente discontinuo de sacarosa (derecha). gRNA, RNA genómico viral; sgRNA-R4, RNA subgenómico que incluye el fragmento R4 derivado del minigenoma M26, mRNA-N, mRNA viral de la nucleoproteína;  $\beta$ -actina, mRNA de  $\beta$ -actina celular; virus -RNAsa, viriones no tratados con RNAsa; virus +RNAsa, viriones tratados con RNAsa. Se muestra la media de dos experimentos para cada tipo de purificación. Las barras indican la desviación estándar. (B) Análisis por RT-PCR en tiempo real de los RNAs encapsidados y tratados con RNAsa A en ausencia o no del detergente NP40. Se representa el resultado para la muestra purificada en colchón de sacarosa.

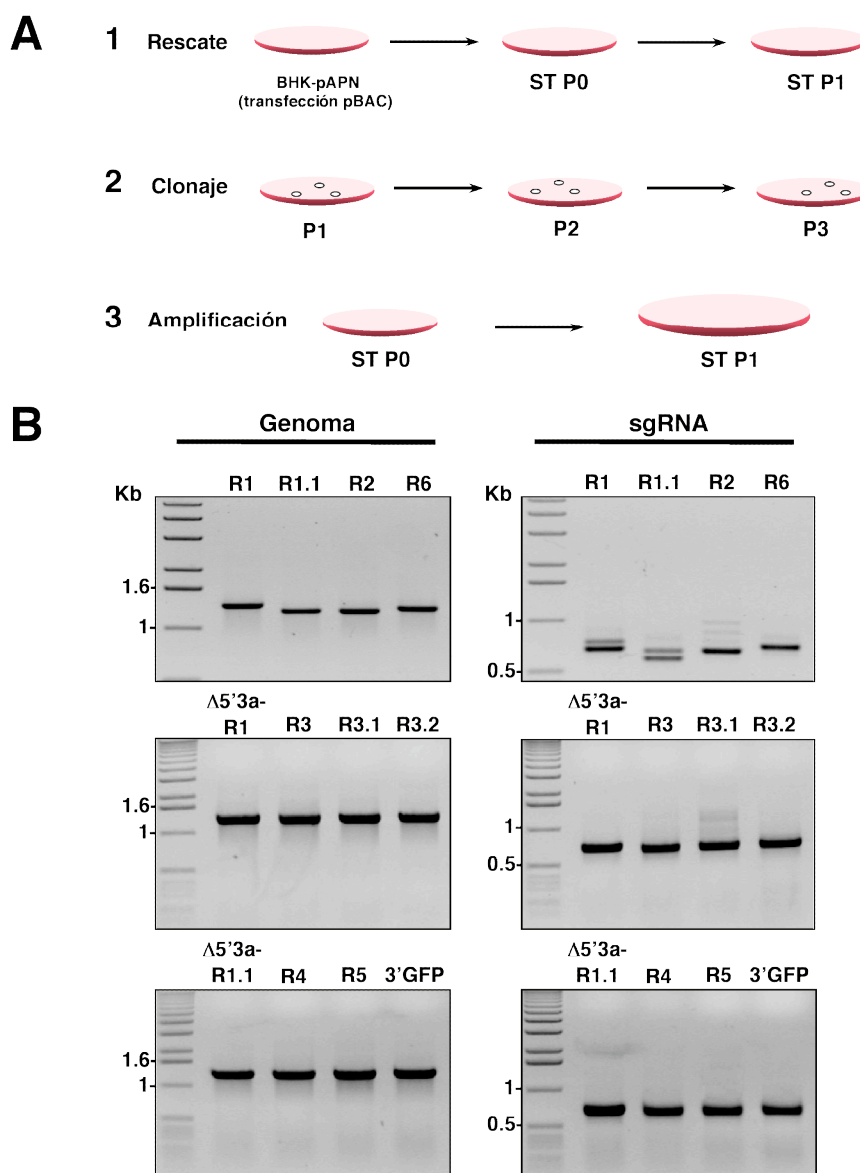
Al igual que ocurriría con el análisis de las secuencias requeridas para la replicación, el estudio de la encapsidación de minigenomas con bajo rescate requiere trabajar en el pase P0. Los minigenomas que no se replican no se podrían amplificar en pases sucesivos y no se podría estudiar el rescate. Asimismo, el estudio de la encapsidación de genomas defectivos en pase P0 está dificultado por el hecho de que los niveles de RNA de minigenomas replicados ineficientemente son muy bajos respecto a minigenomas con las señales de replicación intactas, siendo difícil discriminar los procesos de replicación y encapsidación. Un análisis adecuado de estos procesos, que independizase la amplificación de los RNAs cuya encapsidación se deseaba estudiar, requería de un proceso de replicación independiente de la maquinaria viral y podría ser un sistema de lanzamiento de secuencias potencialmente responsables de la encapsidación en pase P0 basado en la transcripción de sgRNAs por el TGEV bajo el control de las TRSs de un gen no esencial, en la misma posición de éste. Se eligió el gen no esencial 3a/b, para que la maquinaria viral transcribiese los RNAs a encapsidar, en un proceso independiente de la presencia de señales en *cis* de replicación. Adicionalmente este sistema aseguraba la producción de los RNAs a encapsidar en los mismos compartimentos celulares en que tienen lugar la replicación y ensamblaje de los RNAs genómicos, facilitando su posible encapsidación por el virus. En el apartado 3.4.1. se había descrito la transcripción de RNAs potencialmente responsables de la encapsidación desde un minigenoma M39 y no desde el propio virus. Este sistema requería del rescate de un minigenoma, por lo que no representaba una estrategia de síntesis del RNA a encapsidar directa.

Las secuencias potencialmente responsables de la encapsidación, procedentes del extremo 5' del minigenoma M26 (el más pequeño rescatado eficientemente cuando se realizaron estos estudios), se introdujeron reemplazando al gen no esencial 3a/b en un cDNA infeccioso del TGEV generado en nuestro laboratorio (Almazán y col., 2000). Se utilizó el cDNA del aislado PUR46-MAD con la proteína S recombinante del PTV (TGEV-PUR-S<sub>PTV</sub>) (C. Sánchez y L. Enjuanes, resultados sin publicar) por el mayor título de este virus en cultivos de células ST, lo que constituye un requerimiento indispensable para el eficiente rescate de minigenomas (J.M. Sánchez-Morgado y L. Enjuanes, resultados no publicados). El extremo 5' del minigenoma M26 (exceptuando el líder) se dividió en regiones de entre 400 y 500 nt que solapaban entre sí, al menos, 100 nt. Estas regiones, precedidas por las TRSs del gen 3a/b, se denominaron R1.1 a R6 (Fig. 28). Además, se realizó una construcción en la que se introdujeron 400 nt de origen no viral (región 3' del

gen de la GFP) en la misma posición, como control negativo de encapsidación. El proceso de transcripción discontinua viral generaría un sgRNA formado por la secuencia líder, la CS, 80 nt del extremo 5' del gen parcialmente deletado 3a, incluida su TRS 3' (5'3a), la región de interés derivada del extremo 5' del minigenoma M26, la secuencia 3' del gen 3b y el extremo 3' completo del mRNA-3a/b (Fig. 28).



**Figura 28. Clonaje de las regiones solapantes derivadas del extremo 5' del minigenoma M26 en el cDNA del TGEV.** Se representa el genoma completo del TGEV y, ampliada, la región del gen 3a/b, que se deletó parcialmente, manteniéndose 80 nt del extremo 5' (5'3a), formado por 23 nt de la 3'TRS 3a y 57 nt del extremo 5' del gen 3a, y 122 nt del extremo 3' (3'3b). Entre ambas secuencias se clonaron las regiones en las que se dividió del extremo 5' del minigenoma M26 (R1.1 a R6). Las regiones R1.1 y R1 se clonaron, además, inmediatamente después de la CS del gen 3a/b (en rojo), de forma que el proceso de transcripción discontinua generaría un sgRNA con el extremo 5' idéntico al del genoma viral. En el extremo 3' de la secuencia R1.1, se añadieron 250 nt del gen de GFP para completar una longitud de 400 nt, similar a la de los demás fragmentos analizados. L, secuencia líder; CS, secuencia conservada. Δ5'3a, delección de los 81 nt del fragmento 5'3a.



**Figura 29. Obtención y caracterización de los virus recombinantes que expresan una colección de RNAs solapantes derivados del extremo 5' del minigenoma M26.** (A) Se muestran los pasos de rescate, clonaje y amplificación seguidos para obtener los virus recombinantes. Se transfectaron células BHK-pAPN con los pBACs que incluyen los cDNAs virales recombinantes. La monocapa de células transfectadas se levantó y se añadió sobre células ST, donde el TGEV alcanza mayores títulos. Después de dos pasos de amplificación (ST P0 y ST P1), los virus se clonaron tres veces consecutivas por aislamiento de placas de lisis en medio semisólido. Los virus clonados se amplificaron dos veces más en células ST. (B) Análisis por RT-PCR del genoma viral (en la región del inserto) y del sgRNA transcrito, en el pase P1 de rescate, previo al clonaje. El genoma tiene el tamaño correcto en todos los casos, en contraste al sgRNA de los virus R1.1 y R1, que produjo dos bandas. La secuenciación de los dos productos de PCR indicó que la banda superior se corresponde con el transcrito esperado y la inferior representa un producto de delección que carece de la región 5'3a, de forma que se recupera la continuidad entre el líder y la región 5' del genoma viral, generando un extremo 5' análogo al del virus TGEV.

Los cDNAs infectivos se rescataron como se describe en *Materiales y Métodos* y el nivel de la transcripción de cada uno de los RNAs subgenómicos se analizó por RT-PCR cualitativa (Fig. 29A y B). Los RNAs amplificados por RT-PCR se secuenciaron en todos los casos y se observó que la mayoría de RNAs subgenómicos se transcribían correctamente y no presentaban mutaciones ni recombinaciones en su secuencia original. Sin embargo, en una fracción de los transcritos R1.1 y R1 se eliminó la secuencia 5'3a, dando lugar a dos poblaciones de RNA, con y sin la región 5'3a, que migraban en geles de agarosa en bandas de tamaño diferenciado (Fig. 29B). En estos RNAs subgenómicos se reconstituyó un extremo 5' análogo al del RNA genómico viral, con una continuidad entre la secuencia líder y la región 5' del gen de la replicasa. Teniendo en cuenta estos resultados, en los que se seleccionaron RNAs con la continuidad líder-región 5', se construyeron por genética reversa los virus recombinantes  $\Delta 5'3a$ -R1.1 y  $\Delta 5'3a$ -R1, donde el sgRNA transcrito ya contiene en el virus modificado esta continuidad de secuencia existente en el genoma original del virus (Fig. 28). La transcripción de estos RNAs subgenómicos se controlaba, por tanto, desde la TRS 3' del líder.

Todos los virus recombinantes generados se clonaron tres veces por aislamiento de placa de lisis y se amplificaron dos veces para obtener el virus para los siguientes experimentos, como se describe en *Materiales y Métodos*. Al final de este proceso se volvió a analizar por RT-PCR la expresión de los RNAs subgenómicos (resultados no mostrados), comprobándose que mantenían la secuencia original clonada, a excepción de los virus R1.1 y R1, donde se encontraban transcritos con la secuencia original introducida en el virus y RNAs subgenómicos que habían perdido la región 5'3a, como se ha descrito previamente. Adicionalmente, se comprobó que todos los virus generados crecían con títulos similares a los del TGEV-PUR-S<sub>PTV</sub> silvestre (resultados no mostrados).

### **3.4.5. ESTUDIO DE LA ENCAPSIDACIÓN DE RNAs SUBGENÓMICOS CONTENIENDO SECUENCIAS POTENCIALMENTE RESPONSABLES DEL EMPAQUETAMIENTO DEL RNA**

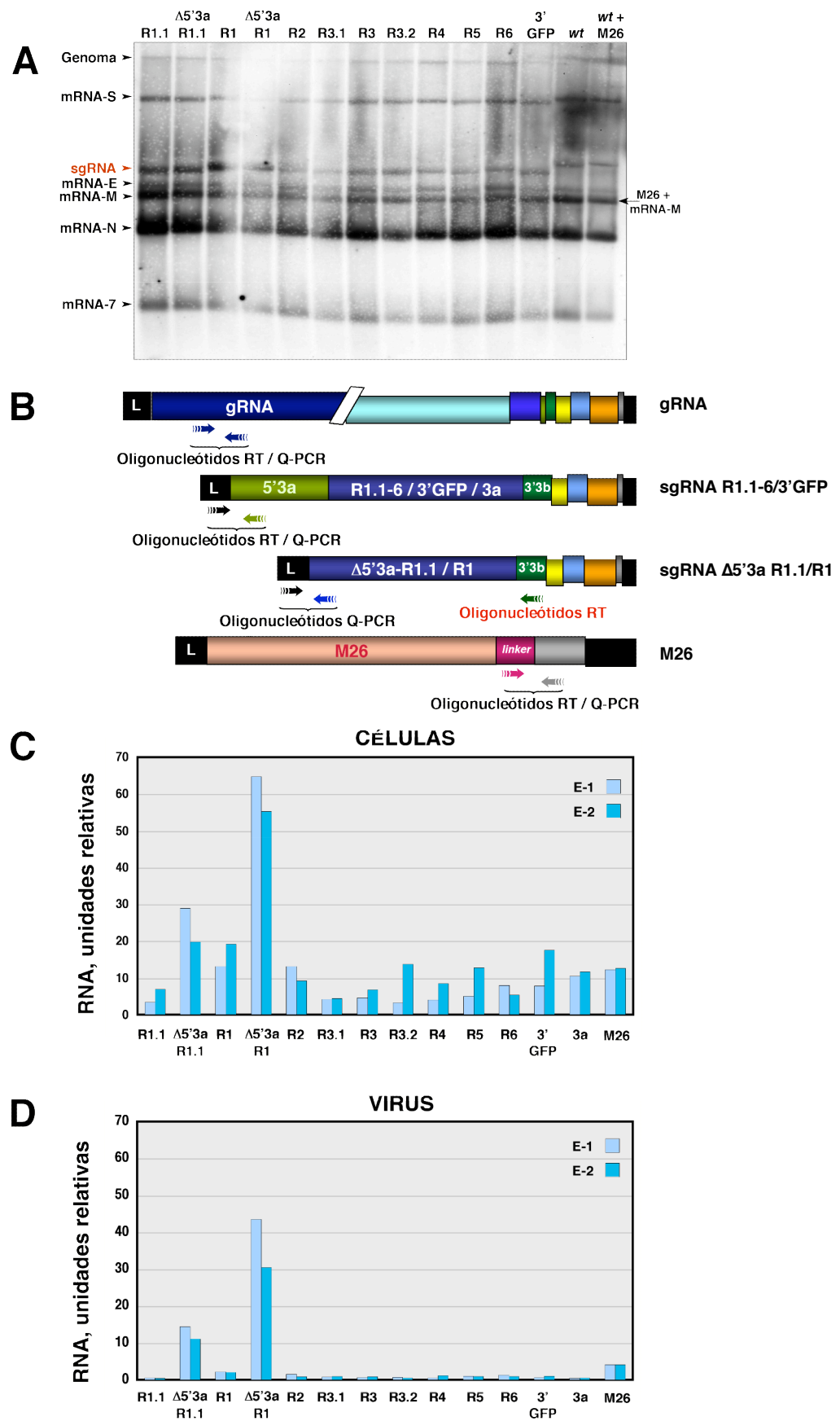
Inicialmente, la transcripción de los RNAs subgenómicos lanzados por los virus recombinantes se analizó directamente en las células infectadas (pase P0). Con este propósito se realizó un ensayo de *Northern blot* con una sonda complementaria al extremo 3', común al gRNA y los mRNAs (Fig. 30A). Todos los virus transcribieron un sgRNA con el tamaño esperado. Los mRNAs virales también tenían el tamaño correcto, no

detectándose especies recombinantes. Por tanto, la inserción en el genoma del TGEV de secuencias del extremo 5' del genoma viral, y la expresión del sgRNA que las contienen, no pareció interferir con el crecimiento del virus.

Para la cuantificación por RT-PCR en tiempo real de los diferentes RNAs transcritos se utilizaron los oligonucleótidos descritos en *Materiales y Métodos*. Los virus que transcriben las regiones 5'3a-R1.1, 5'3a-R1 a R6 y 3'GFP se detectaron con oligonucleótidos que reconocen la secuencia líder-CS3a y la secuencia 3'TRS del gen 3a/b (Fig. 30B). En los virus recombinantes R1.1 y R1, aunque existe una mezcla de transcritos, con y sin la región 5'3a, los oligonucleótidos de la RT-PCR sólo detectarían el sgRNA con la secuencia 5'3a intacta. Los virus que transcribían las secuencias  $\Delta$ 5'3a-R1.1 y  $\Delta$ 5'3a-R1 poseen una región 5' idéntica a la del genoma viral. Para evaluar específicamente estos sgRNAs y diferenciarlos del genoma, se utilizó una reacción de RT que se inicia con un oligonucleótido que mapea en la zona delecionada del gen 3b (3'3b), seguido por una amplificación mediante PCR con el oligonucleótido de polaridad positiva hibridando en el líder y el oligonucleótido de polaridad negativa complementario a la zona 5' del gen de la replicasa (Fig. 30B).

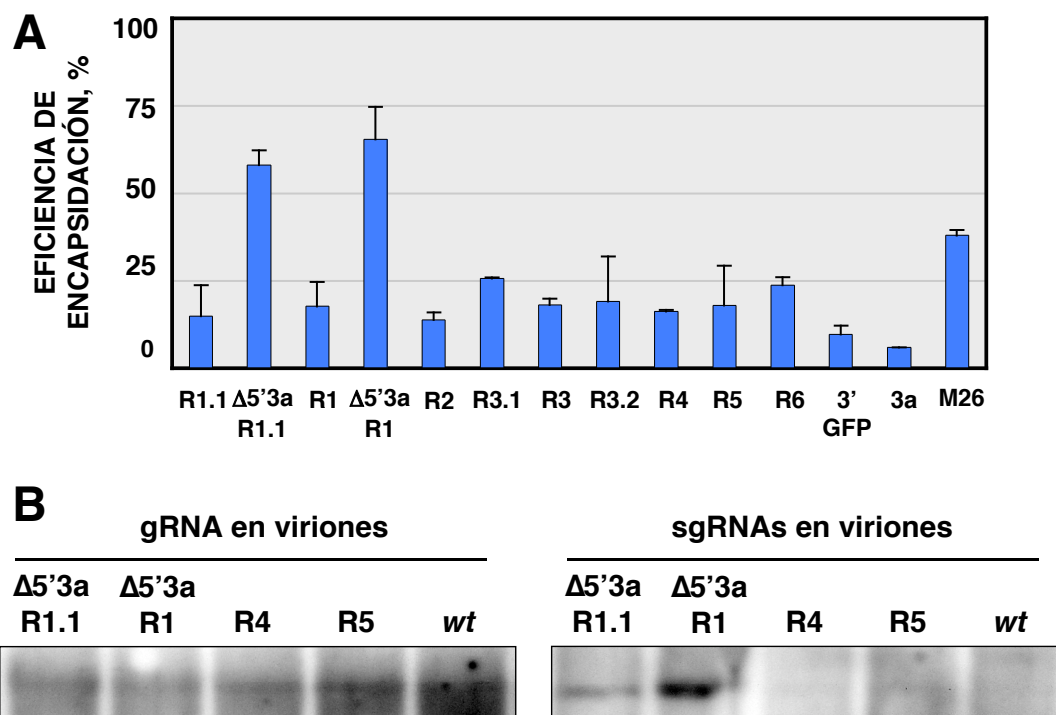
Se evaluó el nivel de transcripción de cada uno de los RNAs subgenómicos y se observó que era similar al del mRNA natural transcrito en la misma posición (mRNA-3a), a

**Figura 30. Evaluación de la transcripción, desde la posición de los genes 3a/b, de los RNAs subgenómicos que incluyen las secuencias del extremo 5' del minigenoma M26 y detección en los viriones.** (A) Análisis por *Northern blot* de la expresión de los RNAs subgenómicos mensajeros en células infectadas con los virus recombinantes. *Wt*, RNA del virus TGEV-PUR-S<sub>PTV</sub> parental. *Wt* + M26, RNA de células de pase P3 que contienen el minigenoma M26 y el virus complementador TGEV-PUR-S<sub>PTV</sub> (la banda del RNA M26 solapa con la del mRNA-M). 3'GFP, RNA de virus recombinante que expresa desde la posición 3a/b el extremo 3' de GFP. (B) Esquema de distintas especies de RNA y las posiciones en que hibridan los oligonucleótidos en las reacciones de RT y de PCR. En todos los casos el oligonucleótido de la reacción de RT fue el mismo que el oligonucleótido reverso de la PCR, excepto para los RNAs subgenómicos  $\Delta$ 5'3a-R1.1 ó 5'3a-R1, donde el oligonucleótidos de la reacción de RT se situó en la región 3'3b, para favorecer la síntesis del cDNA del sgRNA (500 pb) frente al gRNA (21 kb desde la posición de hibridación de los oligonucleótidos). (C) y (D) Análisis por RT-PCR cuantitativa de la presencia de cada sgRNA en células infectadas y en viriones purificados en un colchón de sacarosa al 15%, respectivamente. Se realizaron dos experimentos independientes para cada evaluación (E1 y E2). 3a, mRNA-3a en el virus *wt*. M26, RNA del minigenoma M26 rescatado por el virus TGEV-PUR-S<sub>PTV</sub>.



## resultados

excepción de las secuencias  $\Delta 5'3a$ -R1.1 y  $\Delta 5'3a$ -R1 (Fig. 30C) que presentaban mayores niveles de RNA probablemente debido a la transcripción desde una TRS 3' diferente al resto, la del líder, mucho más eficiente según trabajos previos (Zúñiga y col., 2004) o a la posible replicación basal de estos fragmentos, fundamentalmente el RNA  $\Delta 5'3a$ -R1. Debe tenerse en cuenta que la replicación de estos RNAs, de producirse, no puede ser eficiente dado que contienen menos de 500 nt del extremo 5' del genoma viral.



**Figura 31. Análisis de la encapsidación de los RNAs subgenómicos transcritos desde la posición 3a/b que incluyen las secuencias del extremo 5' del minigenoma M26.** (A) La eficiencia de encapsidación de cada sgRNA transcrito por el virus se calculó según la fórmula descrita en *Materiales y Métodos*. La encapsidación de cada sgRNA se normalizó con respecto a la del genoma viral, a la que se asignó un valor del 100%. M26, minigenoma M26 rescatado en pase P3 por el virus PUR-S<sub>PTV</sub>. 3'GFP, sgRNA que incluye 400 nt del extremo 3' del gen de GFP. 3a, mRNA transcrito por el virus silvestre en la posición 3a (mRNA-3a). Se representa el promedio de dos experimentos independientes con su desviación estándar. (B) Análisis por *Northern blot* del RNA viral, detectando la presencia del gRNA y del sgRNA de los virus  $\Delta 5'3a$ -R1.1,  $\Delta 5'3a$ -R1, R4, R5 y del virus nativo (wt). Se utilizó una sonda complementaria al extremo 3' del virus.

Para analizar la encapsidación en viriones de los RNAs subgenómicos transcritos por los virus recombinantes, se utilizó el protocolo de purificación parcial en un colchón de



sacarosa al 15% descrito en el apartado 3.4.3. La presencia del sgRNA en los viriones parcialmente purificados se determinó por RT-PCR en tiempo real (Fig. 30D). La abundancia de cada RNA, relativa al genoma encapsidado, se utilizó para calcular la eficiencia de encapsidación de cada molécula, teniendo en cuenta los niveles de expresión en las células infectadas, como se describe en *Materiales y Métodos*. Los RNAs  $\Delta 5'3a$ -R1.1 (242 nt, incluido el líder) y  $\Delta 5'3a$ -R1 (598 nt, incluido el líder), que presentan continuidad de secuencia líder-genoma en el extremo 5', dado que carecen de la región 5'3a, son las únicas moléculas encapsidadas eficientemente de todas las analizadas (Fig. 31A). La eficiencia de encapsidación de ambos RNAs fue, aproximadamente, de un 60% respecto a la del genoma, superior a la del control positivo, el minigenoma M26 rescatado en pase P3 que, en este experimento, alcanzó una eficiencia de encapsidación del 40%. En contraste, los controles negativos del encapsidación, los RNAs 3'-GFP y el mRNA-3a, encapsidaron con una eficiencia menor del 10%. El resto de RNAs subgenómicos analizados presentaron un nivel de encapsidación similar al obtenido para el mRNA-N en experimentos previos (aproximadamente 20%). Análogamente, la presencia de los sgRNAs  $\Delta 5'3a$ -R1.1 y  $\Delta 5'3a$ -R1 se detectó por *Northern blot* en el RNA de los viriones purificados en un colchón de sacarosa al 15%, en contraste con los sgRNAs R4, R5 y el mRNA-3a (Fig. 31B).

**Tabla 12. Títulos de los virus recombinantes obtenidos en dos experimentos independientes (E1 y E2).**

Virus	TÍTULO, UFP/ml	
	E-1	E-2
R1.1	$1.5 \times 10^8$	$1.5 \times 10^8$
$\Delta 5'3a$ -R1.1	$3.5 \times 10^8$	$2.0 \times 10^8$
R1	$1.5 \times 10^8$	$1.5 \times 10^8$
$\Delta 5'3a$ -R1	$2.0 \times 10^8$	$3.0 \times 10^7$
R2	$5.0 \times 10^7$	$1.4 \times 10^8$
R3.1	$5.5 \times 10^8$	$1.3 \times 10^8$
R3	$2.0 \times 10^8$	$1.1 \times 10^8$
R3.2	$7.0 \times 10^7$	$4.5 \times 10^7$
R4	$1.5 \times 10^8$	$1.1 \times 10^8$
R5	$2.0 \times 10^8$	$2.5 \times 10^8$
R6	$2.0 \times 10^8$	$5.0 \times 10^7$
3'-GFP	$1.2 \times 10^8$	$2.0 \times 10^8$
wt	$2.0 \times 10^8$	$2.5 \times 10^8$
wt + M26	$1.8 \times 10^8$	$4.5 \times 10^7$

Los virus recombinantes se titularon y se comprobó que no existían diferencias significativas entre los títulos obtenidos (Tabla 12). Los resultados obtenidos indican que la señal de encapsidación de minigenomas derivados del TGEV y, presumiblemente del genoma viral, se localiza dentro de los primeros 242 nt del extremo 5'. Estos datos confirman los estudios previos realizados mediante análisis cualitativo de la encapsidación de secuencias derivadas del extremo 5' del minigenoma M33 lanzadas desde el genoma defectivo M39 (apartado 3.4.1.). Aunque los sgRNAs más abundantes en las células infectadas son los más abundantes en los viriones en términos absolutos, tienen además una encapsidación relativa mayor, lo que sugiere que deben contener una señal de encapsidación que les facilite el proceso.

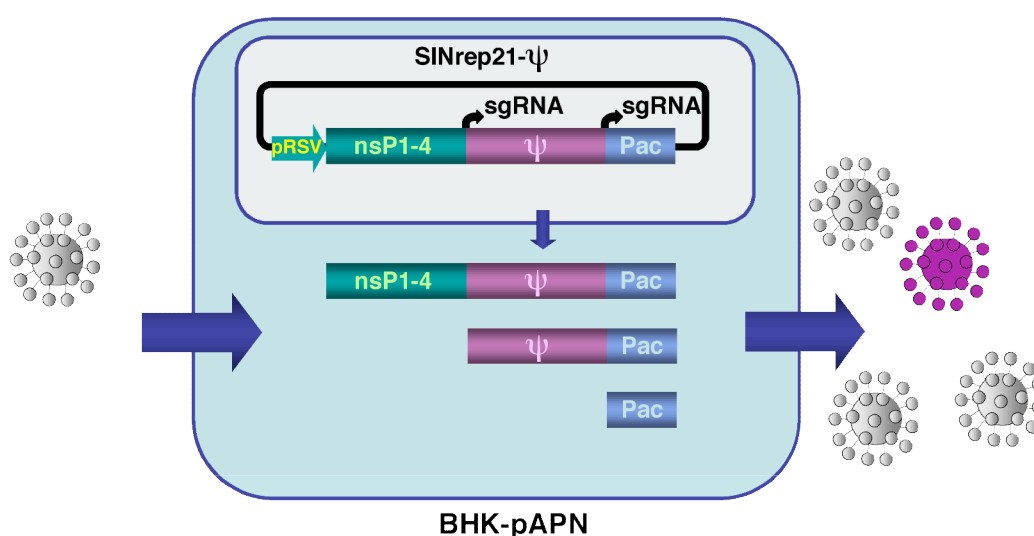
### **3.5. ANÁLISIS DEL POSIBLE ACOPLAMIENTO ENTRE LOS PROCESOS DE REPLICACIÓN Y ENCAPSIDACIÓN.**

#### **3.5.1. GENERACIÓN DE REPLICONES DEL VIRUS SINDBIS EXPRESANDO LAS REGIONES POTENCIALMENTE RESPONSABLES DE LA ENCAPSIDACIÓN EN EL TGEV**

Los resultados obtenidos indicaban que la señal de encapsidación del TGEV se localizaba en el extremo 5'. Adicionalmente, los RNAs subgenómicos  $\Delta 5'3a$ -R1.1 y  $\Delta 5'3a$ -R1 incluyen el extremo 3' del mRNA-3a, por lo que no podía descartarse el requerimiento del extremo 3' para la encapsidación, junto con la región 5'. La señal de encapsidación no podía encontrarse exclusivamente en el extremo 3' puesto que todos los mRNAs virales lo incluyen y, sin embargo, la mayoría de ellos no encapsida, o lo hace a niveles significativamente más bajos que el RNA específicamente encapsidado (mRNA-N). Alternativamente, en un análisis en el que se acentúa la prudencia en la interpretación de los resultados de los experimentos de encapsidación realizados, no puede descartarse que la replicación sea un requerimiento para la encapsidación, como ocurre en otros virus (Nugent y col., 1999; Khromykh y col., 2001; Volkova y col., 2006). Los RNAs subgenómicos encapsidados podrían tener una replicación basal, dado que contienen parte del extremo 5' del genoma. No obstante, dado que su longitud es, como máximo, de 500 nt, y se requiere una longitud en torno a 1150 nt para una replicación mínima, de replicarse lo harían con una eficiencia mínima. Alternativamente, el proceso de transcripción por el cual se generan

podría “suplir” a la replicación, en el que caso de que la replicación sea necesaria para el proceso de encapsidación.

Por todo lo anterior se decidió transcribir secuencias potencialmente responsables de la encapsidación en el TGEV, como sgRNAs, utilizando el replicón no citopático derivado del alfavirus Sindbis en células BHK-pAPN (Frolov y col., 1994; Agapov y col., 1998) (Fig. 32). El replicón utilizado incluye dos promotores de mRNAs subgenómicos: el promotor de la región 3’ transcribe el gen *pac* (puromicina N-acetiltransferasa), que confiere a la célula



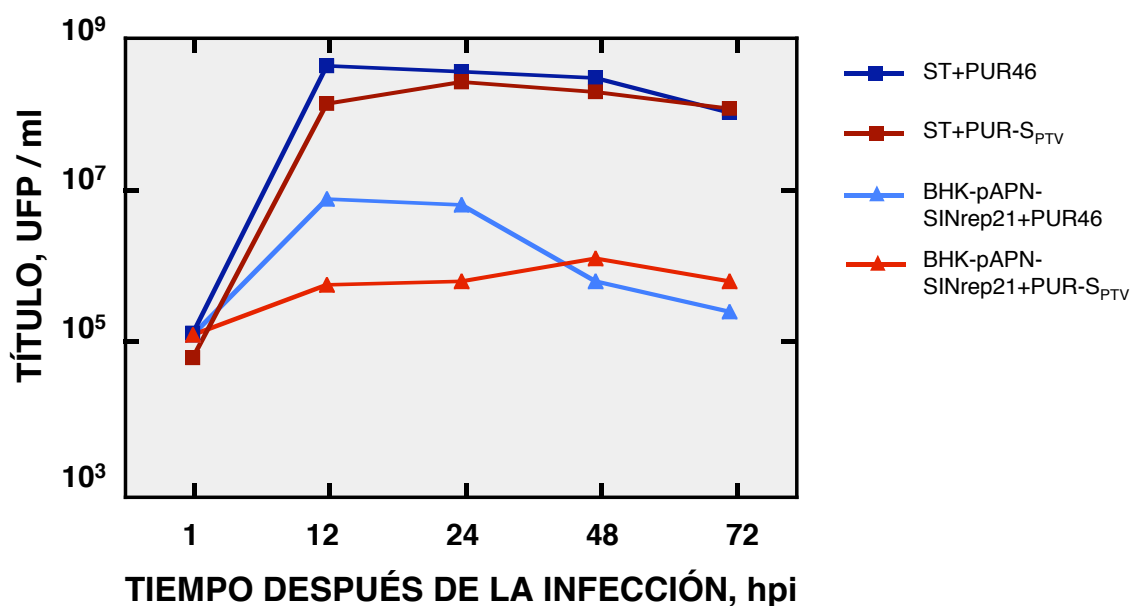
**Figura 32. Esquema del ensayo de encapsidación de RNAs subgenómicos transcritos por el replicón del virus Sindbis.** Células BHK-pAPN se transfectan con los plásmidos expresando el replicón no citopático del virus Sindbis, que se transcribe en el núcleo desde el promotor del virus del sarcoma de Rous (pRSV). El RNA autorreplicativo se transloca al citoplasma y allí genera RNAs subgenómicos, el sgRNA que incluye las secuencias con la señal de encapsidación del TGEV ( $\Psi$ ), y el sgRNA que le confiere resistencia a puromicina (Pac). Las células expresando establemente el replicón del virus Sindbis se infectan con el TGEV y se analiza la presencia del RNA que incluye la señal de encapsidación en los viriones liberados en la infección. En color gris se representan los viriones que contienen el gRNA del TGEV y en color rosa, los que contienen el sgRNA transcrito por el replicón del virus Sindbis, que incluye la señal de encapsidación del TGEV. nsP1-4, replicasa del virus Sindbis.

resistencia a puromicina, y el promotor de la región 5’ que transcribe el gen heterólogo de interés; en esta región se introdujo la secuencia que potencialmente incluye la señal de encapsidación del TGEV (Fig. 32).

El fragmento  $\Delta 5'3a-R1.1$ , incluyendo el líder (L- $\Delta 5'3a-R1.1$ ) se seleccionó para ser introducido en el replicón del virus Sindbis, por ser el sgRNA de secuencia más corta encapsidado. Asimismo, se expresó una variante de este sgRNA conteniendo una delección de 20 nt en la secuencia líder ( $\Delta L-\Delta 5'3a-R1.1$ ), para determinar si se requería una secuencia líder completa en el proceso de encapsidación, pero también para reducir la posibilidad de que este RNA se replicase, aunque fuese con niveles basales mínimos. En la zona de la delección se predijo la presencia de un motivo estructural en horquilla, homólogo al motivo SLI descrito en CoVs del grupo 2 (Chang y col., 1994), por predicción de su estructura secundaria. Asimismo, la secuencia 5'3a-R4 precedida por la región del líder (L-5'3a-R4) se expresó con el replicón del virus Sindbis como un control negativo de encapsidación. Como un control negativo adicional se analizó la encapsidación de un RNA sin la región del líder, que incluye la secuencia completa de GFP, transcrita por el replicón del virus Sindbis.

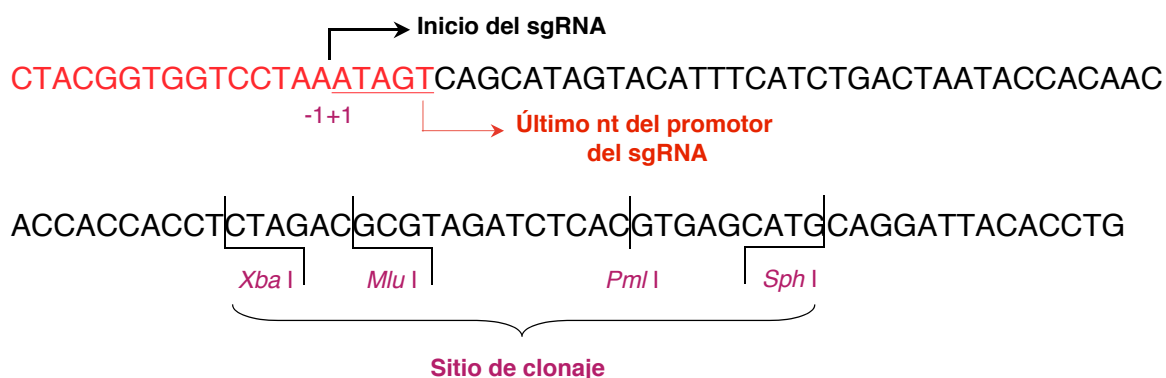
### **3.5.2. ENCAPSIDACIÓN DE RNAs TRANSCRITOS POR EL REPLICÓN DEL VIRUS SINDBIS**

La realización de este experimento ha sido posible por concurrir varias condiciones necesarias para su realización, y por la selección de virus complementadores con un nivel de replicación adecuado. Previamente se había demostrado que el replicón del virus Sindbis, que únicamente se replica en células BHK, no interfiere con la infección del TGEV (Ortego y col., 2002). Debido a que el nivel de replicación del TGEV en células BHK-pAPN, que expresan el receptor para el CoV TGEV, no es suficientemente alto para rescatar a un minigenoma de forma eficiente, ya que alcanza un título máximo de  $10^7$  UFP/ml, frente a un título superior a  $10^8$  UFP/ml en células ST, se comparó el título obtenido por el virus TGEV-PUR-S<sub>PTV</sub>, utilizado en los experimentos de encapsidación, frente al del virus TGEV-PUR46-MAD en células BHK-pAPN que expresaban el replicón vacío de Sindbis. El virus TGEV-PUR46-MAD alcanzó una unidad logarítmica más de título que el TGEV-PUR-S<sub>PTV</sub> (Fig. 33). Dada la importancia del título del virus complementador en experimentos de rescate de minigenomas (J.M. Sánchez-Morgado y L. Enjuanes, resultados no publicados), se seleccionó el virus TGEV-PUR46-MAD para los experimentos de encapsidación en células BHK-pAPN.



**Figura 33. Cinética de crecimiento de los virus TGEV-PUR46-MAD Y TGEV-PUR-S<sub>PTV</sub>.** Células ST o células BHK-pAPN expresando el replicón del virus Sindbis vacío (SINrep21) se infectaron con los virus TGEV-PUR46-MAD ó TGEV-PUR-S<sub>PTV</sub>, a una mdi de 10. El título viral se calculó a los tiempos indicados en células ST o células BHK-pAPN, según se indica.

La transcripción desde el replicón del virus Sindbis, incluido en el plásmido SINrep21 (Agapov y col., 1998), genera una molécula de sgRNA que contiene 50 nt en el extremo 5',

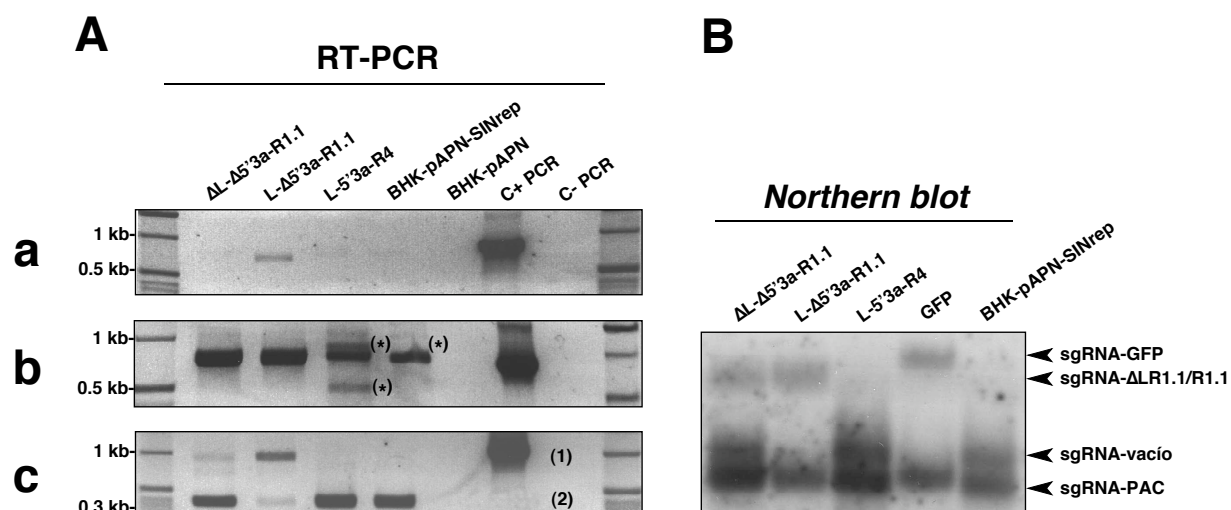


**Figura 34. Esquema del entorno de secuencia en el sitio de clonaje del plásmido pSINrep21 que expresa el replicón del virus Sindbis.** Las regiones derivadas del TGEV se clonaron en los sitios de restricción *Xba* I y *Mlu* I. A partir del replicón se genera un sgRNA precedido en el extremo 5' por 50 nt derivados del promotor (en rojo) del virus Sindbis (no se representa el promotor completo) y del plásmido (en negro). -1, primer nt del lado 5' del promotor de Sindbis; +1, primer nt del sgRNA transcrito por Sindbis.

## resultados

procedentes del alfavirus (Fig. 34). Por tanto, los fragmentos derivados del TGEV incluidos en el replicón no tendrían en el extremo 5' la secuencia líder libre.

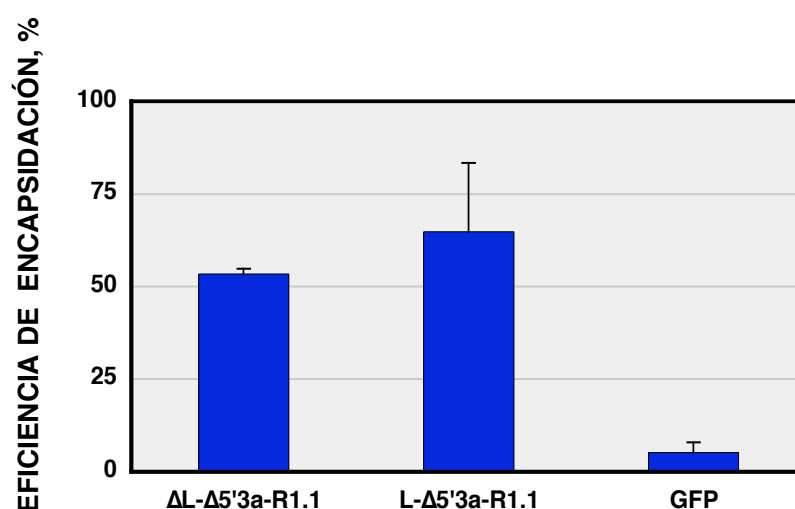
Células BHK-pAPN se transfectaron con los plásmidos que contenían el replicón del virus Sindbis que expresaba los RNAs  $\Delta$ L- $\Delta$ 5'3a-R1.1, L- $\Delta$ 5'3a-R1.1, L- $\Delta$ 5'3a-R4 y GFP. Después de dos pases de selección con puromicina se comprobó la expresión de los distintos RNAs por secuenciación de la banda correspondiente amplificada por RT-PCR y



**Figura 35. Análisis de los sgRNAs, que contienen secuencias del TGEV, transcritos por el replicón del virus Sindbis.** (A) RT-PCR cualitativa de los sgRNAs con secuencias del TGEV expresados por los replicones del virus Sindbis. (a) RT-PCR que amplifica la secuencia líder completa. El oligonucleótido de la RT se situó en la región 3'3b del sgRNA. El cebador de polaridad positiva de la PCR hibridó en la secuencia del motivo SLI del líder eliminada en el sgRNA  $\Delta$ L- $\Delta$ 5'3a-R1.1. (b) RT-PCR que amplifica los sgRNAs con secuencias del TGEV transcritos desde el replicón del virus Sindbis. El oligonucleótido de la RT se situó en la región 3'3b del sgRNA; el oligonucleótido de polaridad positiva de la PCR hibridó en la secuencia del líder común a los sgRNAs que contenían regiones del TGEV. (\*) Amplificaciones obtenidas por hibridación inespecífica de los cebadores de la PCR en la ORF M. (c) RT-PCR que amplifica la región de clonaje de las secuencias del TGEV en el replicón del virus Sindbis. Los oligonucleótidos se hibridaron en secuencias del replicón, flanqueando la región del inserto. (1) Tamaño esperado para el producto de amplificación del replicón del alfavirus Sindbis que contiene los insertos derivados del TGEV. (2) Tamaño esperado para el replicón del virus Sindbis vacío. C+ PCR, control positivo de la reacción de PCR. C- PCR, control negativo de la reacción de PCR. BHK-pAPN-SINrep, células expresando el replicón del virus Sindbis vacío. BHK-pAPN, células BHK-pAPN sin el replicón del virus Sindbis. (B) Northern blot de RNAs celulares con una sonda que hibrida en el extremo 3' del replicón del alfavirus Sindbis, correspondiente al gen PAC. A la derecha se indican los sgRNAs esperados atendiendo a la movilidad electroforética de la banda. GFP, replicón que expresa el gen de GFP; sgRNA-vacío, sgRNA sin inserto; sgRNA-PAC, sgRNA del gen PAC.

separada en geles de agarosa (Fig. 35A). El replicón del virus Sindbis conteniendo el fragmento L- $\Delta 5'3a$ -R4 eliminó el inserto, de forma que únicamente se transcribió el sgRNA que confería resistencia a puromicina. Análogamente, en el replicón que expresaba el fragmento  $\Delta$ L- $\Delta 5'3a$ -R1.1 se detectó la presencia de una pequeña fracción de replicones que habían delecionado el sgRNA insertado, aunque la mayoría de sgRNAs mantenían el RNA de interés. Estos resultados se confirmaron con experimentos de *Northern blot* (Fig. 35B). Los RNAs subgenómicos  $\Delta$ L- $\Delta 5'3a$ -R1.1 y L- $\Delta 5'3a$ -R1.1 transcritos por el replicón habían delecionado 82 nt de la región 3'3b que no afectaba a la hibridación del oligonucleótido de la reacción de RT, utilizado en la cuantificación de los niveles de RNA, dado que este oligonucleótido es complementario a la región no eliminada.

Las células BHK-pAPN transformadas con los distintos replicones se infectaron con el virus TGEV-PUR46-MAD. Los sobrenadantes de la infección se recogieron a las 24 hpi y se purificaron en un colchón de sacarosa al 15%, como se ha descrito en el apartado 3.4.3. El análisis por RT-PCR cuantitativa determinó que los RNAs  $\Delta$ L- $\Delta 5'3a$ -R1.1 y L- $\Delta 5'3a$ -R1.1 eran eficientemente encapsidados en los viriones. En contraste, el RNA de GFP apenas era detectado en virus parcialmente purificados (Fig. 36). Por RT-PCR convencional



**Figura 36.** Evaluación de la encapsidación de los RNAs subgenómicos, que contienen secuencias del TGEV, transcritos por el replicón del virus Sindbis. La eficiencia de encapsidación de cada sgRNA transcrito por el replicón se calculó con la fórmula descrita en el apartado 2.7.5.1 de *Materiales y Métodos*. Siguiendo este procedimiento, la encapsidación de los sgRNAs expresados desde el replicón del alfavirus Sindbis se normalizó respecto a la del gRNA del TGEV, al que se asignó una eficiencia de encapsidación del 100%. Se representa la media de dos experimentos, con su desviación estándar.

## **resultados**

se comprobó que el sgRNA  $\Delta L-\Delta 5'3a-R1.1$  mantenía la delección de 20 nt en el líder (resultados no mostrados) sin embargo, los análisis realizados no podían discernir si los RNAs habían eliminado la secuencia derivada del promotor del replicón del virus Sindbis en el extremo 5'. Los sobrenadantes del experimento se evaluaron y no se observaron diferencias entre los títulos de los virus complementadores (Tabla 13).

**Tabla 13. Título del virus TGEV-PUR46-MAD en los experimentos de encapsidación de RNAs expresados desde el replicón de Sindbis.**

TÍTULO, UFP/ml		
Virus	E-1	E-2
$\Delta L-\Delta 5'3a-R1.1$	$6.7 \times 10^6$	$2.0 \times 10^7$
$L-\Delta 5'3a-R1.1$	$3.3 \times 10^6$	$2.7 \times 10^6$
SINrep-GFP	$6.7 \times 10^6$	$6.0 \times 10^6$
BHK-SINrep21	$4.0 \times 10^6$	$6.0 \times 10^6$
BHK	$6.7 \times 10^6$	$1.0 \times 10^7$

Estos resultados indican que (i) para la encapsidación de RNAs por el virus TGEV son suficientes los nucleótidos 25 a 242 del extremo 5' del genoma. Dado que estos RNAs no incluyen el extremo 3' del TGEV sino secuencias heterólogas, (ii) el extremo 3' del virus no es necesario para la encapsidación y, (iii) la encapsidación del genoma del TGEV es independiente de la replicación de la molécula por la maquinaria del virus, a diferencia de lo que ocurre en otros sistemas virales.



*discusión*



En la primera parte de esta tesis se analiza el rescate de minigenomas sintéticos derivados del TGEV como una estrategia para la localización de señales en *cis* implicadas en la replicación y la encapsidación del virus. En la segunda parte de esta memoria se describen experimentos que discriminan entre secuencias requeridas para replicación y para encapsidación. En la tercera parte se analiza la posible existencia de una relación entre estos dos procesos, dado que la encapsidación podría estar acoplada a la replicación, como ocurre en otros virus RNA como flavivirus (Khromykh y col., 2001), picornavirus (Nugent y col., 1999) y el virus de la encefalitis equina venezolana (Volkova y col., 2006).

En estudios previos sobre la localización de señales de replicación y encapsidación en CoVs no se evaluaron las eficiencias de los procesos de replicación y encapsidación mediante técnicas que analizasen de forma fiable la cantidad de RNA (Makino y col., 1990; Fosmire y col., 1992; Kim y col., 1993; Lin y Lai, 1993; Penzes y col., 1994; Chang y col., 1994; Luytjes y col., 1996; Bos y col., 1997; Woo y col., 1997; Cologna y Hogue, 2000; Narayanan y Makino, 2001; Raman y col., 2003; Raman y Brian, 2005). En nuestro laboratorio, utilizando como modelo experimental el TGEV, se había cuantificado indirectamente la eficiencia de rescate y de replicación de minigenomas (Izeta y col., 1999). En dichos estudios se analizó la expresión de un gen trazador (GUS) transcrito desde un genoma defectivo, lo que indicaba que en la cuantificación de la replicación del minigenoma se evaluaba, además, la transcripción y la traducción del gen, lo que podía condicionar los resultados porque se asumía que la transcripción y la traducción no afectaban al resultado final (Izeta y col., 1999). En esta tesis se utiliza la RT-PCR en tiempo real para la medida directa de las eficiencias de rescate de minigenomas, lo que incluye su replicación y encapsidación.

## **4.1. SECUENCIAS MÍNIMAS REQUERIDAS PARA EL RESCATE DE MINIGENOMAS DERIVADOS DEL TGEV**

### **4.1.1. ANÁLISIS DEL REQUERIMIENTO DE SECUENCIAS INTERNAS DEL GENOMA VIRAL PARA EL RESCATE DE GENOMAS DEFECTIVOS**

En el TGEV se desconocía si existe un requerimiento de secuencias adicionales a las regiones 5' y 3' para replicación y encapsidación. Hasta la fecha, todos los minigenomas rescatados estudiados incluían los extremos 5' y 3' y, además, secuencias internas derivadas del genoma del virus (Izeta y col., 1999). En esta tesis se demuestra que los 2144

nt iniciales del extremo 5' y los 494 últimos nt del extremo 3' de TGEV son suficientes para una replicación y encapsidación (rescate) eficiente de minigenomas derivados del virus. En los estudios realizados se ha mostrado que el minigenoma M26 tiene la misma eficiencia de rescate que el minigenoma M33, que presenta 568 nt adicionales procedentes de la región solapante entre las ORFs 1a y 1b, y 16 nt derivados de la ORF 1b y el gen S. Este minigenoma era el RNA defectivo más pequeño eficientemente rescatado hasta la fecha. Estos resultados difieren de los obtenidos para CoVs del grupo 2. En MHV, además del requerimiento de los extremos 5' y 3', se ha descrito la necesidad de una región interna para la replicación de minigenomas (Lin y Lai, 1993; Kim y col., 1993) y para la encapsidación (Makino y col., 1990; Fosmire y col., 1992), aunque es importante resaltar que los trabajos publicados por estos grupos son contradictorios. En efecto, hay estudios que indican que en MHV los extremos 5' y 3' son suficientes para la replicación de minigenomas, no requiriéndose secuencias internas (Luytjes y col., 1996). La adición de la señal de encapsidación de MHV, que incluía 69 nt situados a 20 kb del extremo 5', a un RNA no viral, el gen trazador CAT, le confería la capacidad de encapsidarse en viriones, aunque de forma ineficiente (Woo y col., 1997). Sin embargo, otros resultados indican que esta señal de encapsidación no sería por si sola suficiente, sugiriendo la existencia en el genoma de otras señales *en cis* de encapsidación (Bos y col., 1997).

Como se ha indicado anteriormente, el TGEV no requiere secuencias internas del genoma para la replicación y encapsidación de minigenomas. Estudios sobre la replicación del MHV realizados con DI-RNAs han mostrado que mientras que los extremos del genoma de MHV son necesarios para la síntesis de la cadena positiva, para la síntesis de la cadena de polaridad negativa sólo son necesarios los últimos 55 nt y la cola de poli-A presente en el extremo 3' del genoma (apartado 1.3.2. de la *Introducción*). Ello ha llevado a postular que los extremos 5' y 3' del genoma pueden interaccionar durante la replicación del genoma, tal como se predice en el estudio de las interacciones intramoleculares durante el plegamiento del genoma RNA en un medio libre de proteínas, utilizando simulaciones mediante programas de ordenador (Sgro y col., 2004). Sin embargo, los extremos 5' y 3' de los genoma de CoVs no son complementarios, por lo que nuestro laboratorio y otros laboratorios (Lai y col., 1998; Huang y col., 2001) proponen que pueda existir una interacción entre los extremos 5' y 3' mediada por proteínas. Los resultados de rescate obtenidos con el minigenoma M26 son compatibles con la hipótesis de la interacción de los extremos 5' y 3' en CoVs (Huang y col., 2001; C. Galán, F. Almazán y L. Enjuanes,

resultados no publicados). Las secuencias reconocidas por las proteínas virales o celulares para la replicación y encapsidación estarían localizadas exclusivamente en los extremos 5' y 3'. La interacción de los extremos facilitaría el reconocimiento de estas regiones por las proteínas.

#### **4.1.2. REQUERIMIENTO DE LA TRADUCCIÓN DE LA ORF CONTENIDA EN EL RNA DE LOS MINIGENOMAS DERIVADOS DEL TGEV PARA SU RESCATE**

El requerimiento de la traducción de una ORF para el rescate eficiente de minigenomas derivados de CoV es controvertido, existiendo trabajos en los que se describe que la traducción es necesaria (Chang y Brian y col., 1996; de Groot y col., 1992; van der Most y col., 1995) y otros en los que se concluye que la presencia de una ORF larga no sería un requerimiento para la replicación eficiente del minigenoma (Liao y Lai, 1995; Penzes y col., 1996). Así, el minigenoma M24 tiene un rescate 100 veces menos eficiente que el minigenoma M26, pese a que, en principio, tiene una ORF potencialmente traducida más larga. Los minigenomas delecionados en motivos de estructura secundaria tampoco presentan una correlación entre la longitud de la ORF traducida y la eficiencia de su rescate. En estos minigenomas, generalmente, la ORF es más larga cuanto más alejada está la deleción del extremo 5'. Así, por ejemplo, el minigenoma SL16, con una ORF de 549 aa, se rescata en el pase P3 aproximadamente 1000 veces menos eficientemente que el minigenoma M26, que contiene una ORF de 613 aa. Por otro lado, el minigenoma SL10, con una ORF mucho más corta (241 aa), rescata unas 100 veces menos eficientemente que el genoma defectivo M26.

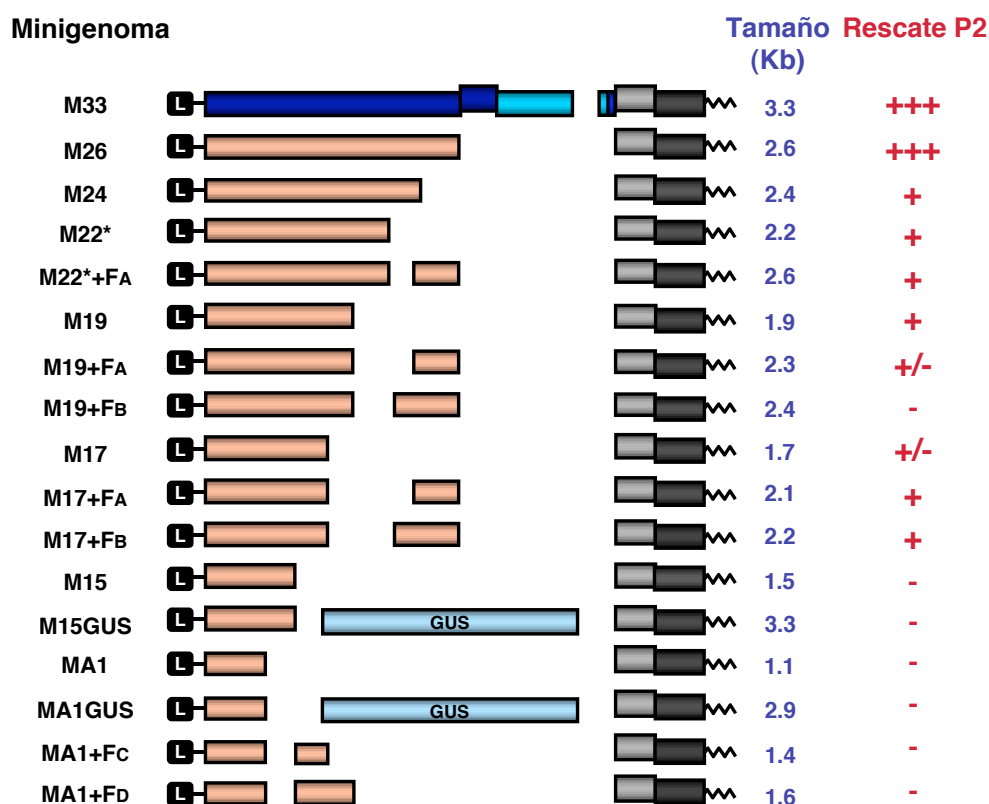
En situaciones especiales la traducción de la ORF de un minigenoma, debido a la producción de una proteína, puede afectar a la replicación. Así por ejemplo, se ha descrito la existencia de una mutación en la posición 637 del genoma del TGEV, que eliminaría un sitio de reconocimiento de corte de una proteasa viral. Los minigenomas con esta mutación, que poseen A o T en la posición descrita, traducirían una poliproteína truncada que no se procesaría, pero que son rescatados por un virus complementador. Por el contrario, las moléculas defectivas con la secuencia original del genoma (C o G), aún teniendo secuencias 5' y 3' suficientes para el rescate, se perdían después de varios pases en cultivos (Galán y col., 2005). Se ha propuesto que el rescate ineficiente se debería a la proteína truncada traducida por el minigenoma. Ello posiblemente se debe a la interferencia del fragmento truncado de la replicasa con la replicación mediada por la proteína de longitud

completa, aunque se desconoce con certeza el mecanismo por el que esta proteína ejercería su efecto. Se especula que la proteína truncada procesada (minigenomas con la secuencia original del genoma en la posición 637) secuestraría los RNAs en complejos de replicación no funcionales, impidiendo su acceso a la replicación en *trans*. Así, el rescate de genomas defectivos derivados del TGEV parece depender, no tanto de la longitud de la ORF traducida, como de la toxicidad de la proteína codificada por el minigenoma. Para evitar la posible interferencia en todos los minigenomas de esta tesis se ha mantenido la mutación A/T637 para no afectar el rescate en cultivos.

#### **4.1.3. REGIÓN 5' MÍNIMA REQUERIDA PARA EL RESCATE DE MINIGENOMAS. INFLUENCIA DEL TAMAÑO DEL MINIGENOMA Y DE LA MULTIPLICIDAD DE INFECCIÓN**

El minigenoma M26 se utilizó para localizar con mayor precisión las señales de replicación y encapsidación del TGEV, construyendo mutantes de delección en los que se eliminaron secuencias del extremo 5' del minigenoma. En primer lugar, la secuencia mínima del extremo 5' suficiente para el rescate de minigenomas con un virus complementador se redujo a 1150 nt (genoma defectivo M17). Sin embargo, para CoVs del grupo 2 las secuencias del extremo 5' requeridas para el rescate son menores, en torno a los 500 nt, tal como se ha indicado anteriormente (Lin y Lai, 1993; Kim y col., 1993; Luytjes y col, 1996). No obstante, en principio existía la posibilidad de que regiones internas en el extremo 5' del minigenoma M26 se pudieran deleccionar, manteniéndose el rescate del genoma defectivo. Esta posibilidad se analiza más adelante.

Dado que todos los minigenomas con delecciones que acortaban el extremo 5' del genoma perdían eficiencia en su rescate respecto al genoma defectivo M26, se analizó si la introducción de regiones presentes en el minigenoma M26, que no estaban incluidas en determinados minigenomas, tales como las regiones FA, FB, FC y FD, mejoraba el rescate de genomas defectivos. En ningún caso se observó que la introducción de estas secuencias aumentase los niveles de rescate de minigenomas (M17, M19 y M22) que no se amplificaban tan eficientemente como el genoma defectivo M26 (Fig. 37). Asimismo, tampoco se consiguió el rescate del minigenoma MA1 por la adición de las regiones FC o FD.



**Figura 37. Resumen de la cuantificación del rescate de minigenomas con un virus complementador.** Se muestra un esquema de todos los minigenomas analizados en esta tesis (a excepción de los que presentaban deleciones de motivos de estructura secundaria). Se indica su tamaño (en kb) y la eficiencia de su rescate, cuantificada en pase P2 por RT-PCR en tiempo real a partir de, al menos, tres experimentos independientes por cada minigenoma. El rescate eficiente de los minigenomas M26 y M33 se representa como (+++).(+) indica un nivel de rescate entre 50 y 100 veces inferior; (+/-) eficiencia de rescate 500 veces inferior y (-), eficiencia, al menos, 1000 veces inferior a la de los genomas defectivos M26 y M33. El minigenoma M22 se marca con asterisco (\*) para indicar que su secuencia es diferente a la del minigenoma M22 anteriormente descrito (Izeta y col., 1999), aunque posee una longitud similar (2.2 kb).

La actividad de un RNA frecuentemente están asociadas a motivos de estructura secundaria presentes a lo largo de su secuencia, por lo que se eliminaron estructuras secundarias previstas por el programa mFOLD. Se realizaron deleciones cortas (30-50 nt) para localizar dominios concretos que afectaran el rescate, presentes en el extremo 5' del minigenoma M26. Todas las deleciones que se introdujeron afectaron negativamente a la eficiencia de rescate de los genomas defectivos. La evaluación del rescate de estos genomas defectivos se realizó en el pase P1, debido a la alta frecuencia de recombinación observada

en el pase P5, mediante la que se recuperaba la secuencia delecionada. Muy probablemente, el minigenoma recombina con el extremo 5' del virus complementador para recuperar un extremo 5' más conveniente para su replicación óptima. Los minigenomas se podían agrupar en tres grupos, según se rescatasen con una eficiencia de 100 (SL3 a SL5, SL8, SL10 a SL13, SL15 y SL17) a 1000 (SL9, SL14, SL16) veces menor que la del minigenoma M26, o con un nivel de rescate próximo a los niveles del fondo de la reacción de RT-PCR (SL1, SL2, SL6 y SL7). En estos minigenomas la recombinación no permitió analizar la persistencia de los genomas defectivos con los pases, sólo se estudió la disminución de los niveles de RNA en el pase P1. Como conclusión general, se observó que la deleción de secuencias cortas formando horquillas de RNA de acuerdo con el programa mFOLD a lo largo del extremo 5' del minigenoma M26, afectaron al rescate del minigenoma en todos los casos. Varias de estas deleciones, correspondientes a los minigenomas SL1 (nt 198-246), SL2 (nt 265-296), SL6 (nt 637-682) y SL7 (nt 793-804), causaron la pérdida completa del minigenoma con los pases. Todas estas deleciones se situaron en los 800 primeros nt del genoma, lo que sugiere que esta región es crítica para el rescate de minigenomas y, probablemente también, para el TGEV.

Los resultados obtenidos están de acuerdo con los trabajos previos en los que se aislaron tres minigenomas naturales derivados del TGEV: DI-A, DI-B y DI-C (Méndez y col., 1996). El minigenoma DI-A contenía la ORF 1a/b completa, sin embargo, los genomas defectivos DI-B y DI-C habían delecionado gran parte del gen 1a/b, pero ambos mantenían intactos los primeros 2144 nt en el extremo 5', la mínima región que se ha demostrado que es necesaria para un rescate eficiente.

Así mismo, en esta tesis se ha descartado que el tamaño en si mismo del minigenoma y la mdi en pase P0 fuesen determinantes en el rescate, dentro de unos límites. La introducción de un gen trazador GUS que aumentase el tamaño del minigenoma o el aumento de la mdi hasta 10, no revirtieron el rescate de minigenomas que no se amplificaron.

## **4.2. REQUERIMIENTOS DE SECUENCIA PARA LA ENCAPSIDACIÓN DEL TGEV**



#### 4.2.1. ANÁLISIS DE LA ENCAPSIDACIÓN DE RNAs SUBGENÓMICOS EN VIRIONES

La posible encapsidación de distintos RNAs, incluyendo tRNAs (Levin y Seidman, 1979; Peters y Hu, 1980), RNAs ribosomales (Muriaux y col., 2001), mRNAs celulares (Adkins y Hunter, 2000) y mRNAs subgenómicos (Hofmann y col., 1990; Rumenapf y col., 1995; Sethna y col., 1991; Zhao y col., 1993), así como RNAs de distinta naturaleza (Muriaux y col., 2001) se ha descrito en retrovirus, coronavirus y alfavirus.

Algunos CoVs, incluyendo el TGEV, en principio podrían encapsidar los RNAs subgenómicos, además del RNA genómico (Hofman y col., 1990; Sethna y col., 1991; Zhao y col., 1993). La encapsidación de mRNAs subgenómicos en viriones de CoV ha sido ampliamente debatida. Se ha sugerido que algunos mRNAs subgenómicos del BCoV se encapsidan con eficiencias superiores al genoma del virus (Hofmann y col., 1990), llegándose a proponer que los CoVs pudieran contener un genoma segmentado formado por los RNAs subgenómicos encapsidados en los viriones (Sethna y col., 1989, 1991). Como consecuencia, únicamente bastaría la encapsidación de los mRNAs para producir virus infectivos (Sethna y col., 1989). Sin embargo, esta teoría ha sido descartada en la actualidad, dado que en preparaciones del virus MHV con un grado de pureza elevado, normalmente no se han detectado los mRNAs del virus y, cuando se ha visto que los mRNAs están presentes en los viriones, éstos se encuentran en pequeñas cantidades, asociados a contaminaciones de las preparaciones (Fosmire y col., 1992; Kim y col., 1998). Además, existe un argumento relevante en contra del requerimiento de sgRNAs para tener un CoV infectivo, dado que se ha demostrado que para obtener virus infectivo únicamente se requiere el RNA genómico, mediante la obtención de cDNAs infectivos para los CoVs TGEV (Almazán y col., 2000), HCoV (Thiel y col., 2001), IBV (Casais y col., 2001), MHV (Yount y col., 2002), SARS-CoV (Almazán y col., 2006) y HCoV-OC43 (St-Jean y col., 2006). Por tanto, la hipotética función de los mRNAs subgenómicos del CoVs como genoma segmentado ha sido completamente descartada. Sin embargo, se ha descrito que la presencia de proteína N (en *cis* o en *trans*) mejora notablemente la actividad de replicones derivados del TGEV (Almazán y col., 2004), por lo que la existencia de mRNAs codificando esta proteína al iniciarse el ciclo infectivo en el citoplasma celular podría acelerar los procesos de replicación y transcripción.

Con el fin de determinar la composición en RNA de los viriones del TGEV, inicialmente se analizó la presencia de RNAs subgenómicos en virus inmunopurificados mediante RT-

PCR cualitativa. Mediante estas técnicas, únicamente se observó la amplificación del genoma del TGEV en viriones, pero no de otros RNAs, virales o celulares. No obstante, cuando posteriormente se utilizó una técnica más sensible, como la RT-PCR en tiempo real, se detectó de manera reproducible, además del genoma viral, los mRNAs virales más abundantes en las células infectadas. Fundamentalmente se observó la presencia del mRNA-N (la eficiencia de encapsidación fue como máximo del 25%, aunque ésta varió entre experimentos). Por el contrario, RNAs celulares, como el de la  $\beta$ -actina, reflejaron unos niveles de encapsidación muy bajos (entre el 1-2%). La presencia de RNAs diferentes al genoma en los viriones, parecía estar relacionada con la abundancia relativa de estos mRNAs en la célula infectada, por lo que probablemente se trataría de un proceso de incorporación inespecífica de estos RNAs en los viriones. En el caso de que todos los mRNAs del TGEV se encapsidasen, los más probable es que tuviesen una señal de encapsidación común. Dado que todos los mRNAs virales tienen en común la secuencia líder y el extremo 3'-UTR, en estas regiones podría localizarse la señal de reconocimiento específico del RNA y todos los mRNAs deberían encapsidar con la misma eficiencia. Sin embargo, sólo se ha observado la presencia de algún mRNA en los viriones, lo que va en contra de la presencia de una hipotética señal de encapsidación de los mRNAs de TGEV presente en la secuencia líder o en el extremo 3'. Dado que el genoma viral completo y ciertos minigenomas muestran una encapsidación claramente superior a la de los mRNAs debe de existir un mecanismo de encapsidación específico de estos RNAs.

### **4.2.2. SEÑALES DE ENCAPSIDACIÓN ESPECÍFICA DE RNAs EN CIS**

Inicialmente, en esta tesis se localizó la señal de encapsidación del TGEV en los 649 primeros nt del extremo 5'. No obstante, los resultados se obtuvieron mediante una técnica cualitativa que no permitía la cuantificación precisa de la eficiencia de encapsidación. Asimismo, en algunos transcritos se observó una recombinación del sgRNA encapsidado (región A1) mediante la que se perdía una diana de clonaje *Sal I* entre el líder y el mRNA-A1, por lo que no se podía descartar que el RNA encapsidado hubiera adquirido las secuencias necesarias para encapsidar mediante una recombinación y, por tanto, que el RNA encapsidado no fuera el transcrito codificado por el minigenoma construido originalmente. Este extremo no se comprobó inicialmente mediante experimentos de *Northern blot*. Reforzando la posibilidad teórica de una alteración del sgRNA encapsidado por recombinación con el genoma del virus complementador, en estudios posteriores de

esta tesis se comprobó la elevada frecuencia de recombinación entre el virus complementador y minigenomas derivados del TGEV con deleciones de estructuras en horquilla, RNAs subgenómicos transcritos por el virus con una región espaciadora entre el líder y el extremo 5', o RNAs subgenómicos transcritos por el replicón de Sindbis. Por todo ello, se puso un especial cuidado en analizar la estructura de las moléculas de RNA encapsidadas.

En esta tesis, la cuantificación de los RNAs encapsidados se ha realizado por RT-PCR en tiempo real, lo que ha proporcionado una visión más precisa de la encapsidación de RNAs de CoVs. La localización de la señal de encapsidación se acotó con más precisión al identificar que el genoma defectivo M26 se rescataba tan eficientemente como el M33 y era de menor tamaño. Teniendo en cuenta los datos previos sobre recombinación entre minigenomas y virus complementador, durante el rescate de minigenomas con pequeñas deleciones, se analizó la transcripción de RNAs subgenómicos (incluyendo las secuencias del extremo 5' del minigenoma M26 expresadas) desde las TRSs del gen no esencial 3a/b, utilizando un genoma de longitud completa. La ventaja de esta estrategia radicó en que la encapsidación de estos RNAs era independiente de la presencia de señales de replicación en *cis* en el RNA sintetizado, en contraste con lo que ocurre con los RNAs de minigenomas que para su producción requieren la presencia de estas señales. Este sistema, similar al utilizado previamente en la transcripción de mRNAs desde el minigenoma M39, presentaba varias ventajas respecto al anterior. Por un lado, al expresar los sgRNAs con el genoma del virus se aseguraba la localización de los RNAs estudiados en los lugares de replicación y ensamblaje habituales para los RNAs virales, facilitando su posible encapsidación por el virus. Asimismo, el lanzamiento de las secuencias de interés no dependía del rescate previo de un minigenoma, como en los experimentos con el minigenoma M39. En la nueva serie de experimentos se utilizó el minigenoma M26 rescatado en fase P3 como control positivo de encapsidación. Mediante esta nueva estrategia la señal de encapsidación del TGEV se localizó en los primeros 242 nt del extremo 5' del virus, lo que confirmó los análisis realizados previamente en mRNAs transcritos por el minigenoma M39. Este resultado, según el cual la señal de encapsidación del CoV TGEV mapea en el extremo 5', se considera más aceptable que el descrito para el virus MHV, dado que coincide con el obtenido para la mayoría de los virus RNA, donde las señales de encapsidación también se han localizado en el extremo 5' del genoma y no en el interior del mismo (Tabla 14).

## discusión

Los resultados obtenidos indicaban que la secuencia líder, o parte de la misma, era necesaria para la encapsidación, siendo la región  $\Delta 5'3a$ -R1.1, los primeros 143 nt que siguen al líder, insuficientes, puesto que el sgRNA R1.1, que carece de continuidad entre la secuencia líder y el extremo 5' que le sigue en el virus nativo no se encapsidó. La señal de encapsidación estaría formada por secuencias del extremo 3' del líder y los primeros nucleótidos que siguen a éste. Alternativamente, podría suceder que la señal de encapsidación se localizara en la secuencia que sigue al líder, pero que cuando se inserta la región 5'3a la señal de encapsidación no adquiriría la estructura secundaria necesaria que le confiere la actividad de encapsidación. La necesidad de la continuidad entre las secuencias del líder-extremo 5' se refuerza por la observación de una recombinación en los RNAs R1.1 y R1, que conduce a la recuperación de esta continuidad de secuencia.

**Tabla 14. Localización de señales de encapsidación en otros virus.**

Virus	Familia	Genoma (a)	Localización de la señal de encapsidación	Referencia
Virus de la Hepatitis B	<i>Hepadnaviridae</i>	dsDNA	Extremo 5' del RNA pregenómico	Junker-Niepmann y col., 1990
Adenovirus	<i>Parvoviridae</i>	ssDNA	Repeticiones terminales invertidas	Hearing y col., 1987
Virus de la Gripe	<i>Orthomyxoviridae</i>	ssRNA(-)	Extremos 5' del genoma	Tchatalbachev y col., 2001
Virus de la Rabia	<i>Rhabdoviridae</i>	ssRNA(-)	3'-UTR	Yang y col., 1998
Virus de la Estomatitis Vesicular	<i>Rhabdoviridae</i>	ssRNA(-)	5' y 3' UTRs	Blumberg y col., 1983
Virus Bunyamwera	<i>Bunyaviridae</i>	ssRNA(-)	Extremo 5' del genoma	Osborne y Elliot, 2000
Hantavirus	<i>Bunyaviridae</i>	ssRNA(-)	Extremo 5' del genoma	Severson y col., 2001
HIV	<i>Retroviridae</i>	ssRNA(+)	Extremo 5' del genoma	Lever y col., 1989
Poliovirus	<i>Picornaviridae</i>	ssRNA(+)	Varias regiones; acoplada a replicación	Nugent y col., 1999
Flavivirus	<i>Flaviviridae</i>	ssRNA(+)	Varias regiones; acoplada a replicación	Khromykh y col., 1998
Virus del Mosaico del Bromo	<i>Bromoviridae</i>	ssRNA(+)	ORF MP y extremo 3'	Choi y Rao, 2003

(a) dsDNA, DNA de doble cadena; ssDNA, DNA de cadena sencilla; ssRNA(-), RNA de cadena sencilla y polaridad negativa; ssRNA(+), RNA de cadena sencilla y polaridad positiva

Puesto que los RNAs  $\Delta 5'3a$ -R1.1 y  $\Delta 5'3a$ -R1 son los más abundantes en las partículas virales, podría pensarse que su presencia en los viriones se debe a un “arrastre” de material

por los niveles de estos RNAs en las células infectadas. Sin embargo, el mRNA-N es aproximadamente diez veces más abundante en células infectadas que la región  $\Delta 5'3a$ -R1 y su eficiencia de encapsidación fue, en el mejor de los casos, alrededor del 25%. Análogamente, la eficiencia de encapsidación de los RNAs  $\Delta 5'3a$ -R1.1 y  $\Delta 5'3a$ -R1 fue similar, a pesar de que el segundo era el doble de abundante que el primero.

Para evaluar los RNAs subgenómicos que contenían la región 5'3a, y los que no la incluían, se utilizaron RT-PCR cuantitativas con diferentes parejas de oligonucleótidos en cada caso, debido a la distinta composición de las secuencias. Ello podría, en principio, reducir la fiabilidad de los resultados de encapsidación, dado que se podría pensar que las diferencias observadas se debían a la distinta eficiencia de los oligonucleótidos utilizados en las amplificaciones por RT-PCR. Esta interpretación se descartó previamente al comprobar que la eficiencia de la reacción de PCR fue similar para todas las parejas de oligonucleótidos utilizadas, dado que la pendiente de la recta estándar de calibración utilizada fue idéntica y a que ésta tenía un valor de  $-3.3$  en todos los casos, lo que indica un 100% de eficiencia de la reacción de PCR. El paso previo a la PCR, la reacción de RT, tampoco difirió en eficacia y, en todo caso, podría afirmarse que era ligeramente menos eficiente para los RNAs subgenómicos  $\Delta 5'3a$ -R1.1 y  $\Delta 5'3a$ -R1 por la mayor longitud del cDNA generado (unos 500 nt frente a los aproximadamente 100 nt de los RNAs subgenómicos con la región 5'3a). Todo ello reforzaba la fiabilidad de los datos obtenidos.

Asimismo, en principio, no se podía descartar que los RNAs subgenómicos encapsidasen porque fuesen amplificados por el virus complementador, puesto que incluían los extremos 5' y 3' del genoma viral, aunque su corta longitud no permitía una amplificación eficiente dado que, incluso, son de menor longitud que el minigenoma M15, con baja eficiencia de rescate. Sin embargo, la replicación del RNA  $\Delta 5'3a$ -R1.1 no ha podido ser detectada con fiabilidad, aunque presenta niveles de RNA ligeramente superiores al resto de los RNAs. Estos niveles son significativos y pueden ser explicados por la transcripción desde la TRS 3' del líder, más eficiente que la TRS 3' del gen 3a/b. Si asumimos que el RNA  $\Delta 5'3a$ -R1 no replica y, puesto que encapsida, el resultado indicaría que la replicación no es un requisito para la encapsidación. Sin embargo hay que tener en cuenta que los RNAs son transcritos por el virus, no pudiéndose descartar que la transcripción esté “supliendo” a la replicación, en el caso de que sea necesaria para la encapsidación. El acoplamiento entre replicación y encapsidación se discute más ampliamente en el apartado 4.4.

En MHV se ha descrito la existencia de una señal de encapsidación de 61 nt localizada a una distancia de 20 kb del extremo 5' (Fosmire y col., 1992). Aparentemente, esta secuencia es necesaria y suficiente para encapsidar un RNA no viral como el gen trazador CAT en viriones de MHV (Woo y col., 1997). Sin embargo, en el citado trabajo no se ha determinado la eficiencia del proceso de encapsidación y, por tanto, no se puede evaluar con precisión el verdadero significado de la señal de encapsidación descrita. De hecho, es bastante probable que la secuencia descrita no sea la principal señal de encapsidación porque la adición de la señal de encapsidación de MHV al gen trazador CAT le conferiría la capacidad de encapsidarse en viriones, sólo de forma ineficiente (Woo y col., 1997). Análogamente, se ha descrito la encapsidación de un sgRNA de MHV que contenía la señal *in cis* requerida, pero la eficiencia de encapsidación de este RNA fue mucho menor que la del DI-RNA parental que lo generó (Bos y col., 1997), sugiriendo que se requieren secuencias adicionales para una encapsidación óptima. De hecho, se han descrito varias secuencias en RNAs de CoV de unión a nucleoproteína que, en principio, podrían contribuir a la encapsidación. Estas secuencias de unión de la proteína N al RNA mapean en la CS y en el líder de los mRNAs de MHV (Nelson y col., 2000).

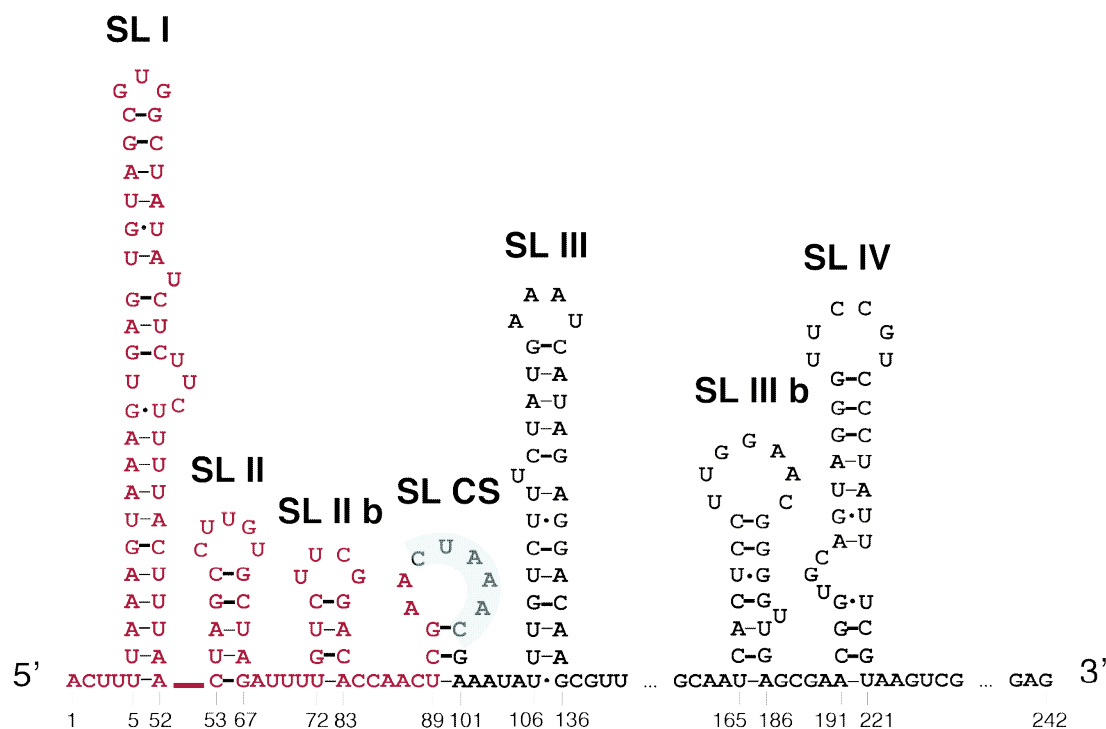
### **4.2.3. ESTRUCTURA SECUNDARIA ASOCIADA A LA SEÑAL DE ENCAPSIDACIÓN**

En la localización de la señal de encapsidación un resultado negativo podría deberse tanto a la ausencia física la señal de encapsidación en el RNA de como a la ausencia de secuencias flanqueantes de la señal de encapsidación, lo que impediría un correcto plegamiento esencial para su actividad. En general, las señales de encapsidación virales se han asociado a estructuras secundarias del RNA, más que a la secuencia primaria de las mismas (de Guzman y col., 1998). Esto sugiere que las secuencias flanqueantes de la señal de encapsidación juegan un papel relevante, puesto que deben tener la suficiente flexibilidad para permitir que la secuencia adquiera una estructura específica (Molenkamp y Spaan, 1997). La delección o inserción de secuencias de los minigenomas puede afectar a su eficiencia de encapsidación por interferencia con el plegamiento de la señal de encapsidación. Esta posibilidad se debe tener en cuenta al estudiar las modificaciones de la secuencia realizadas en esta tesis.

La estructura secundaria del extremo 5' se ha estudiado ampliamente en CoVs del grupo 2, como el BCoV. En la región en la que se ha identificado la señal de encapsidación en el

TGEV se han observado cuatro motivos de RNA en horquilla o *stem loops* (SLI a SLVI) (Chang y col., 1994; Raman y col., 2003; Raman y Brian, 2005). En el resto de CoVs, incluido el TGEV (Fig. 38), estas estructuras estarían conservadas en algunos casos, según predicciones *in silico* de estructura secundaria, especialmente el motivo III. En el SARS-CoV se ha confirmado experimentalmente la existencia de las estructuras I y III donde, además, existe un motivo estructural adicional entre las horquillas II y III (Kang y col., 2006). En el TGEV este motivo de RNA también se formaría, de acuerdo con predicciones de estructura secundaria con el programa mFOLD (Fig. 38).

En esta tesis la localización de la señal de encapsidación se ha acotado a los 242 primeros nt del extremo 5' del genoma del TGEV. Éstos incluyen siete horquillas posibles de estructura secundaria previstas por el programa mFOLD (Fig. 38). Los experimentos realizados en esta tesis para localizar la señal de encapsidación del TGEV, utilizando el replicón del virus Sindbis, indicarían que la estructura SLI no sería necesaria para la encapsidación debido a que cuando se elimina este motivo (sgRNA- $\Delta$ L-R1.1), el RNA resultante es eficientemente encapsidado. Las horquillas SLII, SLIIb y SL CS se encuentran en todos los mRNAs virales, al incluirse en el líder, por lo que tampoco parecen ser candidatas para incluir la señal de encapsidación del TGEV, aunque no puede descartarse que sean necesarias para mantener un correcto plegamiento. Por otro lado, la predicción de estructura secundaria del extremo 5' de los CoVs muestra que la estructura en horquilla SLIII está muy conservada en la mayoría de los grupos de CoVs, con la excepción de los virus MHV y BCoV (Fig. 39). No se observa el mismo grado de conservación en las estructuras SLIIIb y SLIV. Por todo lo anterior, la horquilla SLIII es una estructura candidata para ser la señal de encapsidación en el TGEV y, probablemente, en otros CoVs. De hecho, recientemente se ha sugerido que la señal de encapsidación del SARS-CoV podría estar en el extremo 5' del genoma, aunque se está trabajando en las evidencias experimentales que lo demuestren (Chen y col., 2007). La proximidad de la horquilla SLIII a la región líder podría explicar el requerimiento de continuidad líder-región 5', puesto que la alteración de la secuencia de su entorno en los mutantes en los que se ha introducido una región espaciadora (5'3a) podría impedir el correcto plegamiento. Esta hipótesis se está estudiando mediante experimentos de encapsidación de RNAs en los que se elimina esta estructura secundaria, en comparación con el efecto causado por la delección de otras horquillas.



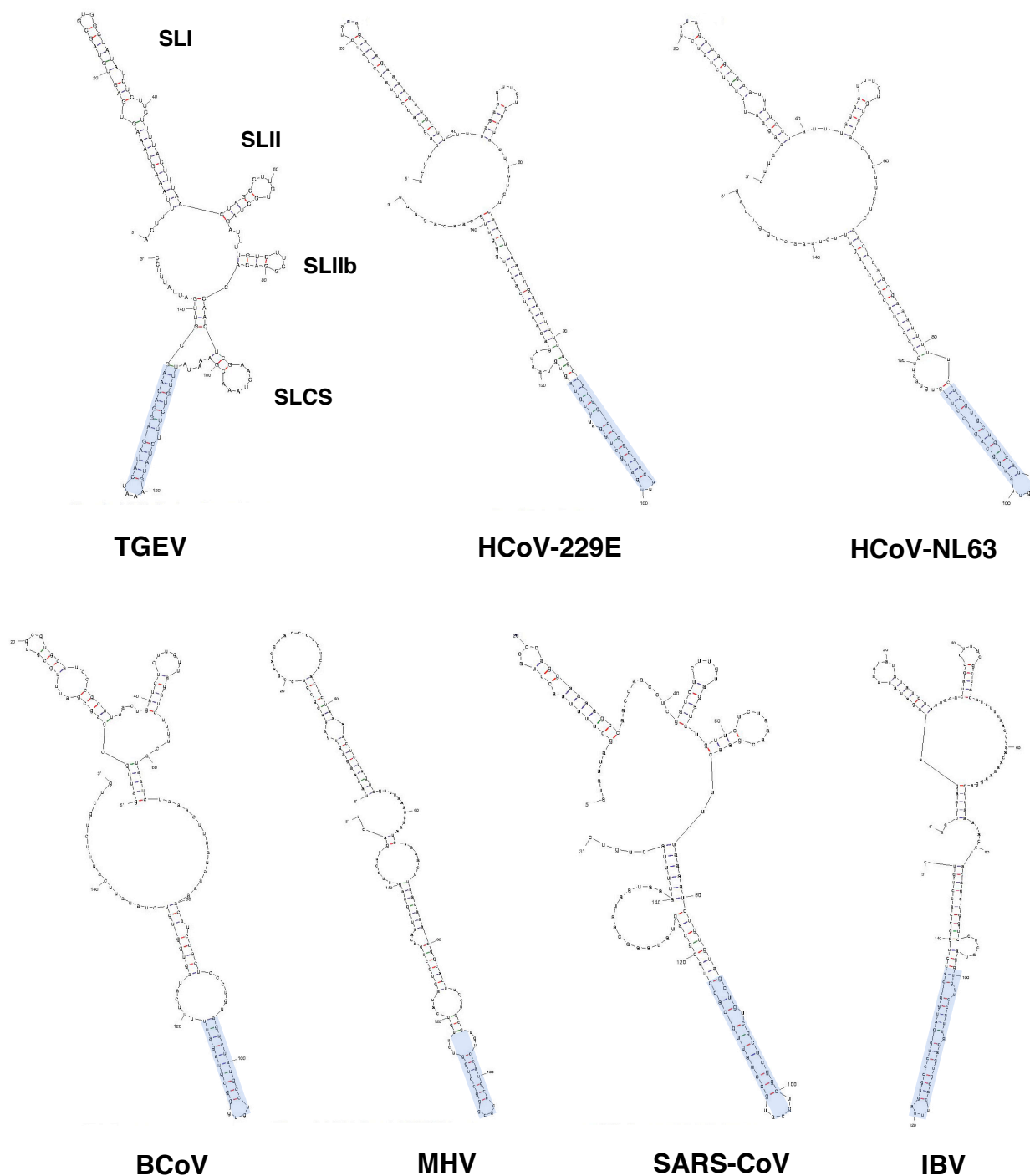
**Figura 38. Predicción de la estructura secundaria del RNA de los primeros 242 nt del extremo 5' del TGEV.** Se muestra un esquema de los motivos en horquilla de los 242 nt de la región 5' del TGEV, previstos por el algoritmo mFOLD (Zuker, 2003). La horquillas I, II, III y IV (SLI, SLII, SLIII y SLIV) se identifican siguiendo la nomenclatura descrita en el BCoV (Chang y col., 1994; Raman y col., 2003; Raman y Brian, 2005), atendiendo a la homología de las estructuras previstas en horquilla de ambos virus. El resto de motivos de RNA (SLIib, SLCS y SLIIIb) no se han descrito en el BCoV. La estructura SL CS se ha confirmado en el SARS-CoV por métodos enzimáticos (Kang y col., 2006). En el TGEV, experimentos de resonancia magnética nuclear han confirmado que la CS se encuentra expuesta, aunque formaría una estructura mucho más abierta que la prevista por el programa mFOLD (J. Gallego, resultados no publicados). La secuencia líder se representa en rojo. La secuencia CS se indica en color azul.

### 4.3. SECUENCIAS MÍNIMAS REQUERIDAS PARA LA REPLICACIÓN DEL TGEV

Todos los minigenomas derivados del TGEV analizados en esta memoria poseen 494 nt en el extremo 3'. Los minigenomas generados previamente en el laboratorio también incluían esta secuencia 3' y no se ha analizado si se necesita toda esta secuencia para su rescate. No obstante, teniendo en cuenta los resultados obtenidos para otros CoVs, lo más probable es que no se puedan delecionar muchos más nucleótidos en dicha región sin que



se afecte la eficacia de la replicación de estos RNAs. Las secuencias mínimas requeridas en *cis* en el extremo 3' para la replicación de CoVs se han caracterizado en detalle en otros



**Figura 39. Predicción de la estructura secundaria del RNA de los primeros 150 nt del extremo 5' de CoVs de los grupos 1, 2 y 3.** Se muestra la predicción de estructura secundaria prevista por el algoritmo mFOLD (Zuker, 2003) para CoVs de los grupos 1a (TGEV), 1b (HCoV-229E y HCoV-NL63), 2a (BCoV y MHV), 2b (SARS-CoV) y 3 (IBV). En azul se indica el motivo SLIII, conservado en el TGEV, HCoV-229E, HCoV-NL63, SARS-CoV e IBV.

miembros de la familia *Coronaviridae*. La longitud del extremo 3' necesaria para la replicación de CoVs del grupo 2 varía, según los trabajos, entre 436 nt (Luytjes y col, 1996), 460 nt (Kim y col., 1993) y 461 (Lin y Lai, 1993).

El trabajo realizado en esta tesis se ha centrado en los requerimientos de secuencia para la replicación del extremo 5' del genoma. Estudios previos del laboratorio (A. Izeta y L. Enjuanes, resultados no publicados) habían concluido que los primeros 1164 nt del extremo 5' eran suficientes para la replicación de minigenomas derivados del TGEV. Sin embargo, en estos ensayos no se podía discriminar entre replicación, transcripción y expresión del gen trazador utilizado (GUS), como se ha indicado en apartados anteriores. Asimismo, la longitud del extremo 5' requerida para la replicación del TGEV era mayor que la descrita para la mayoría de CoVs estudiados en 400-500 nt (Lin y Lai, 1993; Kim y col., 1993; Luytjes y col, 1996). Por ello, se estudió si toda la secuencia incluida en los primeros 1164 nt era necesaria.

En esta tesis se ha demostrado que la eficiencia de replicación de minigenomas derivados del TEGV está muy relacionada con la integridad de todo este extremo 5', y una mayor longitud del extremo 5' se asoció con una mayor eficiencia de replicación. Sin embargo, para longitudes comprendidas entre 1361 nt (minigenoma M19) y 1888 nt en el extremo 5' (minigenoma M24), no se observaron diferencias significativas en los niveles de replicación alcanzados, siendo del 20% respecto al minigenoma M26. Este requerimiento de secuencia es similar al obtenido en los experimentos de rescate, como era de esperar, puesto que todos los RNAs defectivos estudiados en replicación mantienen intacta la secuencia (25-242 nt) donde se ha localizado la señal de encapsidación en el TGEV.

El minigenoma M15, con 940 nt en el extremo 5', mostró una replicación basal, sin embargo, este minigenoma no se rescató en cultivos celulares. Puesto que el genoma defectivo M15 incluye la región donde se localiza la señal de encapsidación, su rescate ineficiente probablemente se debió a su replicación limitada. Por tanto, los minigenomas que incluyen los primeros 940 nt del extremo 5' no se replican con el nivel suficiente para ser rescatados de forma estable por el virus complementador en sucesivos pases, en contraste a lo observado para CoVs distintos del TGEV. El minigenoma M17, con 1150 nt en el extremo 5', se rescató ineficientemente por un virus complementador pero no se perdió con los pases, indicando que contiene las secuencias 5' mínimas necesarias no sólo para su replicación basal, sino que, además, su nivel de amplificación permite su replicación y encapsidación en pases sucesivos. Estos datos confirman resultados previos

del laboratorio (A. Izeta y L. Enjuanes, resultados no publicados) en los que se había concluido que 1164 nt del extremo 5' eran los mínimos suficientes para la replicación eficaz y mantenimiento en cultivos celulares de minigenomas derivados del TGEV.

La eliminación de secuencias en horquilla previstas por el programa mFOLD en la primera kilobase del minigenoma M26, permitió clasificar los distintos mutantes de delección en dos grupos. (i) La delección de las estructuras SL1 (nt 198-246), SL2 (nt 265-296), SL6 (nt 637-682) y SL7 (nt 793-804) redujeron los niveles de replicación alrededor de 80-90 veces respecto a la replicación del genoma defectivo M26. En estos genomas defectivos los niveles de rescate fueron similares al fondo de la reacción de RT-PCR (apartado 4.1.3.). Ello sugiere que estas regiones son fundamentales para la replicación. (ii) La eliminación de las estructuras SL3 (380-426 nt), SL4 (455-502 nt), SL5 (552-609 nt) y SL8 (867-868 nt), disminuyó la eficiencia de replicación de los minigenomas en torno a 10-20 veces respecto al minigenoma M26. Puesto que todos los minigenomas delecionados en estructuras en horquilla en la primera kilobase mantuvieron intacta la señal de encapsidación, se puede concluir que la mayor parte de la primera kilobase del extremo 5' se requería para la replicación eficiente. La longitud mínima del extremo 5' necesaria para la replicación para otros CoVs es, por tanto, inferior a la requerida por el TGEV, del grupo 1. No conocemos todavía por qué la replicación del genoma del TGEV requiere una secuencia de mayor longitud que la necesaria para otros CoVs del grupo 2.

#### **4.4. ANÁLISIS DEL ACOPLAMIENTO ENTRE LA REPLICACIÓN Y LA ENCAPSIDACIÓN DEL GENOMA DEL TGEV**

En principio, la replicación y encapsidación del genoma del TGEV podrían estar acoplados, como ocurre en otros virus RNA de cadena positiva como poliovirus (Nugent y col., 1999), flavivirus (Khromykh y col., 2001) y el virus de la encefalitis equina venezolana (Volkova y col., 2006). Sin embargo, cuando la región que contiene la señal de encapsidación del TGEV (en ausencia del extremo 3', que es imprescindible para la replicación) es transcrita como un sgRNA desde el replicón del virus Sindbis, mantiene su capacidad de encapsidarse en los viriones. Estos resultados demuestran que la replicación del RNA no es un requisito previo para la encapsidación. Además, el sgRNA transcrito desde el replicón del virus Sindbis incorpora 50 nt derivados de la secuencia del promotor del virus Sindbis en el extremo 5' del RNA transcrito, lo que muy probablemente impide su amplificación por el virus complementador. Aunque no puede afirmarse que los RNAs  $\Delta L$ -

## *discusión*

$\Delta 5'3a-R1.1$  y  $\Delta L-\Delta 5'3a-R1$  no hayan perdido esta secuencia, parece poco probable, dado que el sgRNA  $\Delta L-\Delta 5'3a-R1.1$  mantiene la delección de 20 nt introducida en líder, lo que sugiere que no ha recombinado. El conocimiento de los requerimientos para la encapsidación en TGEV deja abierta la posibilidad de encapsidar RNAs de origen no viral en partículas de TGEV.

En resumen, la localización de la señal de encapsidación del TGEV se ha confirmado mediante tres aproximaciones diferentes: (i) estudio de la encapsidación de mRNAs transcritos por el minigenoma M39, (ii) encapsidación de RNAs expresados directamente por el propio virus, como sgRNAs desde la posición 3a/b, y (iii) encapsidación de sgRNAs transcritos por el replicón del virus Sindbis. Este último caso tiene una característica de especial relevancia dado que la generación de sgRNAs es independiente de la maquinaria de replicación del TGEV. El conjunto de los datos obtenidos permite concluir con un grado considerable de fiabilidad que la señal de encapsidación del genoma del TGEV se localiza en los primeros 242 nt del genoma, no siendo necesaria la replicación propiamente dicha de los RNAs para la encapsidación en el virus TGEV. Es suficiente que estos RNAs sean transcritos por un sistema homólogo (coronavirus) o heterólogo (alfavirus).

*conclusiones*



1. El minigenoma más pequeño derivado del TGEV rescatado, es decir, replicado y encapsidado eficientemente en cultivos celulares por un virus complementador, incluye los 2144 primeros y los últimos 494 nucleótidos del genoma viral. Su rescate implica que en estas secuencias 5' y 3' se encuentran localizadas las señales mínimas necesarias para la encapsidación y replicación eficiente de minigenomas y, presumiblemente, del genoma del virus TGEV.
2. La replicación eficiente de minigenomas derivados del TGEV requiere los 2144 nt íntegros del extremo 5'. No obstante, la mínima secuencia del extremo 5' del genoma, imprescindible para la replicación de los genomas defectivos y, presumiblemente del virus, es de 1150 nucleótidos. Secuencias del extremo 5' más cortas mantienen un nivel de replicación basal que no es suficiente para el rescate de minigenomas en los sistemas utilizados. Además, la replicación de minigenomas del TGEV, requiere los 494 nucleótidos del extremo 3' del genoma viral.
3. La señal de encapsidación del TGEV se localiza entre los nucleótidos 25 y 242 nt del extremo 5' del genoma viral, incluyendo 79 nt de la secuencia líder y 143 nt de la región 5' adyacente, siendo necesaria la continuidad de estas secuencias para la encapsidación de RNAs subgenómicos. La encapsidación de RNAs virales, a diferencia de la replicación, no requiere el extremo 3' del genoma.
4. La encapsidación de los RNAs del TGEV no depende de la replicación de los mismos, aunque no se puede excluir que sea necesaria su transcripción por un sistema homólogo o heterólogo, como el del replicón del virus Sindbis.





## ***bibliografía***



**Adam, M.A. y Miller y A.D.** (1988). Identification of a signal in a murine retrovirus that is sufficient for packaging of nonretroviral RNA into virions. *J. Virol.* **62**: 3802-6.

**Adkins, B. y Hunter, T.** (1981). Identification of a packaged cellular mRNA in virions of rous sarcoma virus. *J. Virol.* **39**: 471-80.

**Agapov, E.V., Frolov, I., Lindenbach, B.D., Pragai, B.M., Schlesinger, S. y Rice, C.M.** (1998). Noncytopathic Sindbis virus RNA vectors for heterologous gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 12989-94.

**Almazán, F., Galán, C. y Enjuanes, L.** (2004). The nucleoprotein is required for efficient coronavirus genome replication. *J. Virol.* **78**: 12683-8.

**Almazán, F., DeDiego, M.L., Galán, C., Escors, D., Álvarez, E., Ortego, J., Sola, I., Zúñiga, S., Alonso, S., Moreno, J.L., Nogales, A., Capiscol C. y Enjuanes, L.** (2006). Construction of a SARS-CoV infectious cDNA clone and replicon to study coronavirus RNA synthesis. *J. Virol.* **80**: 10900-6.

**Almazán, F., González, J.M., Penzes, Z., Izeta, A., Calvo, E., Plana-Durán, J. y Enjuanes, L.** (2000). Engineering the largest RNA virus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**: 5516-21.

**Alonso, S., Izeta, A., Sola, I. y Enjuanes, L.** (2002). Transcription regulatory sequences and mRNA expression levels in the coronavirus transmissible gastroenteritis virus. *J. Virol.* **76**: 1293-308.

**Amarasinghe, G.K., Zhou, J., Miskimon, M., Chancellor, K.J., McDonald, J.A., Matthews, A.G., Miller, R.R., Rouse, M.D. y Summers, M.F.** (2001). Stem-loop SL4 of the HIV-1 psi RNA packaging signal exhibits weak affinity for the nucleocapsid protein. structural studies and implications for genome recognition. *J. Mol. Biol.* **314**: 961-70.

## ***bibliografía***

**Banner, L.R., Keck, J.G. y Lai, M.M.** (1990). A clustering of RNA recombination sites adjacent to a hypervariable region of the peplomer gene of murine coronavirus. *Virology*. **175**: 548-55.

**Banner, L.R. y Lai, M.M.** (1991). Random nature of coronavirus RNA recombination in the absence of selection pressure. *Virology*. **185**: 441-5.

**Baric, R.S., Nelson, G.W., Fleming, J.O., Deans, R.J., Keck, J.G., Casteel, N. y Stohlman, S.A.** (1988). Interactions between coronavirus nucleocapsid protein and viral RNAs: implications for viral transcription. *J. Virol.* **62**: 4280-7.

**Baric, R.S., Fu, K., Schaad, M.C. y Stohlman, S.A.** (1990). Establishing a genetic recombination map for murine coronavirus strain A59 complementation groups. *Virology*. **177**: 646-56.

**Baudoux, P., Carrat, C., Besnardeau, L., Charley, B. y Laude, H.** (1998). Coronavirus pseudoparticles formed with recombinant M and E proteins induce alpha interferon synthesis by leukocytes. *J. Virol.* **72**: 8636-43.

**Berkowitz, R., Fisher, J. y Goff, S.P.** (1996). RNA packaging. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **214**: 177-218.

**Bett, A.J., Prevec, L. y Graham, F.L.** (1993). Packaging capacity and stability of human adenovirus type 5 vectors. *J. Virol.* **67**: 5911-21.

**Blumberg, B.M., Giorgi, C. y Kolakofsky, D.** (1983). N protein of vesicular stomatitis virus selectively encapsidates leader RNA in vitro. *Cell*. **32**: 559-67.

**Bohl, E.H.** (1981). Transmissible gastroenteritis, *En "Diseases of swine"* (A.D. Leman, L.D. Glock, W.L. Mengeling, R.H.C. Penny, E. Scholl y B. Straw, eds.), pp. 195. Iowa State University Press, Ames.

**Bos, E.C., Dobbe, J.C., Luytjes, W. y Spaan, W.J.** (1997). A subgenomic mRNA transcript of the coronavirus mouse hepatitis virus strain A59 defective interfering (DI) RNA is packaged when it contains the DI packaging signal. *J. Virol.* **71**: 5684-7.

**Brown, C.G., Nixon, K.S., Senanayake, S.D. y Brian, D.A.** (2007). An RNA Stem-Loop within the Bovine Coronavirus nsp 1 Coding Region is a Cis-Acting Element in DI RNA Replication. *J. Virol.* **81**: 7716-24.

**Calvo, E., Escors, D., López, J.A., González, J.M., Álvarez, A., Arza, E. y Enjuanes, L.** (2005). Phosphorylation and subcellular localization of transmissible gastroenteritis virus nucleocapsid protein in infected cells. *J. Gen. Virol.* **86**: 2255-67.

**Casais, R., Thiel, V., Siddell, S.G., Cavanagh, D. y Britton, P.** (2001). Reverse genetics system for the avian coronavirus infectious bronchitis virus. *J. Virol.* **75**: 12359-69.

**Cavanagh, D., Brian, D. A., Brinton, M. A., Enjuanes, L., Holmes, K. V., Horzinek, M. C., Lai, M. M. C., Laude, H., Plagemann, P. G. W., Siddell, S. G., Spaan, W. J. M., Taguchi, F. y Talbot, P. T.** (1994). The *Coronaviridae* now comprises two genera, *Coronavirus* and torovirus: report of the *Coronaviridae* study group. *Adv. Exp. Med. Biol.* **342**: 255-57.

**Cavanagh, D. y Horzinek, M. C.** (1993). Genus *Torovirus* assigned to the *Coronaviridae*. *Arch. Virol.* **128**: 395-96.

**Cen, S., Javanbakht, H., Kim, S., Shiba, K., Craven, R., Rein, A., Ewalt, K., Schimmel, P., Musier-Forsyth, K. y Kleiman, L.** (2002). Retrovirus-specific packaging of aminoacyl-tRNA synthetases with cognate primer tRNAs. *J. Virol.* **76**: 13111-5.

**Chang, R.Y. y Brian, D.A.** (1996). cis Requirement for N-specific protein sequence in bovine coronavirus defective interfering RNA replication. *J. Virol.* **70**: 2201-7.

**Chang, R.Y., Hofmann, M.A., Sethna, P.B. y Brian, D.A.** (1994). A cis-acting function for the coronavirus leader in defective interfering RNA replication. *J. Virol.* **68**: 8223-31.

**Chang, R.Y., Krishnan, R. y Brian, D.A.** (1996). The UCUAAAC promoter motif is not required for high-frequency leader recombination in bovine coronavirus defective interfering RNA. *J. Virol.* **70**: 2720-9.

**Chen, S.C., van den Born, E., van den Worm, S.H., Pleij, C.W., Snijder, E.J. y Olsthoorn, R.C.** (2007). New structure model for the packaging signal in the genome of group IIa coronaviruses. *J. Virol.* **81**: 6771-4.

**Chen, C.Y., Chang, C.K., Chang, Y.W., Sue, S.C., Bai, H.I., Riang, L., Hsiao, C.D. y Huang, T.H.** (2007). Structure of the SARS coronavirus nucleocapsid protein RNA-binding dimerization domain suggests a mechanism for helical packaging of viral RNA. *J. Mol. Biol.* **368**: 1075-86.

**Chen, H., Gill, A., Dove, B.K., Emmett, S.R., Kemp, C.F., Ritchie, M.A., Dee, M. y Hiscox, J.A.** (2005). Mass spectroscopic characterization of the coronavirus infectious bronchitis virus nucleoprotein and elucidation of the role of phosphorylation in RNA binding by using surface plasmon resonance. *J. Virol.* **79**: 1164-79.

**Choi, K.S., Huang, P. y Lai, M.M.** (2002). Polypyrimidine-tract-binding protein affects transcription but not translation of mouse hepatitis virus RNA. *Virology.* **303**: 58-8.

**Choi, Y.G. y Rao, A.L.** (2003). Packaging of brome mosaic virus RNA3 is mediated through a bipartite signal. *J. Virol.* **77**: 9750-7.

**Cologna, R. y Hogue, B.G.** (1998). Coronavirus nucleocapsid protein. RNA interactions. *Adv. Exp. Med. Biol.* **440**: 355-9.

**Cologna, R. y Hogue, B.G.** (2000). Identification of a bovine coronavirus packaging signal. *J. Virol.* **74**: 580-3.

**Collins, A.R., Knobler, R.L., Powell, H. y Buchmeier, M.J.** (1982). Monoclonal antibodies to murine hepatitis virus-4 (strain JHM) define the viral glycoprotein responsible for attachment and cell-cell fusion. *Virology.* **119**: 358-71.

**Correa, I., Jiménez, G., Suñé, C., Bullido, M.J. y Enjuanes, L.** (1988). Antigenic structure of the E2 glycoprotein from transmissible gastroenteritis coronavirus. *Virus. Res.* **10**: 77-93.

**Cowley, J.A., Dimmock, C.M., Spann, K.M. y Walker, P.J.** (2000). Gill-associated virus of *Penaeus monodon* prawns: an invertebrate virus with ORF1a and ORF1b genes related to arteri- and coronaviruses. *J. Gen. Virol.* **81**: 1473-84.

**Dalton, K., Casais, R., Shaw, K., Stirrups, K., Evans, S., Britton, P., Brown, T.D. y Cavanagh, D.** (2001). cis-acting sequences required for coronavirus infectious bronchitis virus defective-RNA replication and packaging. *J. Virol.* **75**: 125-33.

**Delmas, B., Gelfi, J., L'Haridon, R., Vogel, L.K., Sjostrom, H., Noren, O. y Laude, H.** (1992). Aminopeptidase N is a major receptor for the entero-pathogenic coronavirus TGEV. *Nature.* **357**: 417-20.

**Dhar, A.K., Cowley, J.A., Hasson, K.W. y Walker, P.J.** (2004). Genomic organization, biology, and diagnosis of Taura syndrome virus and yellowhead virus of penaeid shrimp. *Adv. Virus Res.* **63**: 353-421.

**Doyle, L.P. y Hutchings, L.M.** (1946). A transmissible gastroenteritis in pigs. *J. Amer. Vet. Med.* **108**: 257-59.

**Drosten, C., Gunther, S., Preiser, W., van der Werf, S., Brodt, H.R., Becker, S., Rabenau, H., Panning, M., Kolesnikova, L., Fouchier, R.A., Berger, A., Burguiere, A.M., Cinatl, J., Eickmann, M., Escriou, N., Grywna, K., Kramme, S., Manuguerra, J.C., Muller, S., Rickerts, V., Sturmer, M., Vieth, S., Klenk, H.D., Osterhaus, A.D., Schmitz, H. y Doerr, H.W.** (2003). Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.* **348**: 1967-76.

**Dubensky, T.W. Jr., Driver, D.A., Polo, J.M., Belli, B.A., Latham, E.M., Ibanez, C.E., Chada, S., Brumm, D., Banks, T.A., Mento, S.J., Jolly, D.J. y Chang, S.M.** (1996). Sindbis virus DNA-based expression vectors: utility for in vitro and in vivo gene transfer.

## ***bibliografía***

J. Virol. **70**: 508-19.

**Eleouet, J.F., Rasschaert, D., Lambert, P., Levy, L., Vende, P. y Laude, H.** (1995). Complete sequence (20 kilobases) of the polyprotein-encoding gene 1 of transmissible gastroenteritis virus. *Virology*. **206**: 817-22.

**Enjuanes, L., Gebauer, F., Correa, I., Bullido, M.J., Suñe, C., Smerdou, C., Sánchez, C., Lenstra, J.A., Posthumus, W.P. y Melen, R.H.** (1990). Location of antigenic sites of the S-glycoprotein of transmissible gastroenteritis virus and their conservation in coronaviruses. *Adv. Exp. Med. Biol.* **276**: 159-72.

**Enjuanes, L., Gorbalenya, A.E., de Groot, R.J., Cowley, J.A., Ziebuhr, J., y Snijder, E.** (2007). The Nidovirales. En "Encyclopedia of Virology, Third Edition". (B.W.J. Mahy, M. Van Regenmortel, P. Walker y D. Majumder-Russell, eds.), pp. *en prensa*. Elsevier Ltd., Oxford.

**Enjuanes, L., Spaan, W., Snijder, E. y Cavanagh, D.** (2000). Nidovirales, *En* "Virus taxonomy" (M.H.V. van Regenmortel, C.M. Fauquet, D.H.L Bishop, E.B. Carsten, M.K. Estes, S.M. Lenon, M.A. Mayo, D.J. McGeoch, C.R. Pringle y R.B. Wickner, eds.), pp. 827-834. Academic Press, New York.

**Escors, D., Camafeita, E., Ortego, J., Laude, H. y Enjuanes, L.** (2001). Organization of two transmissible gastroenteritis coronavirus membrane protein topologies within the virion and core. *J. Virol.* **24**: 12228-240.

**Fosmire, J.A., Hwang, K. y Makino, S.** (1992). Identification and characterization of a coronavirus packaging signal. *J. Virol.* **66**: 3522-30.

**Frieman, M., Yount, B., Heise, M., Kopecky-Bromberg, S.A., Palese, P. y Baric, R.S.** (2007). Severe acute respiratory syndrome coronavirus ORF6 antagonizes STAT1 function by sequestering nuclear import factors on the rough endoplasmic reticulum/Golgi membrane. *J. Virol.* **81**:9812-24.



**Fritsch, C., Stussi, C., Witz, J. y Hirth, L.** (1973). Specificity of TMV RNA encapsidation: in vitro coating of heterologous RNA by TMV protein. *Virology*. **56**: 33-45.

**Frolov, I., Hoffman, T.A., Pragai, B.M., Driga, S.A., Huang, H.V., Schelesinger, S. y Rice, C.M.** (1996). Alphavirus-based expression systems. strategies and applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**: 11371-7.

**Fu, K. y Baric, R.S.** (1992). Evidence for variable rates of recombination in the MHV genome. *Virology*. **189**: 88-102.

**Fu, K. y Baric, R.S.** (1994). Map locations of mouse hepatitis virus temperature-sensitive mutants: confirmation of variable rates of recombination. *J. Virol.* **68**: 7458-66.

**Galán, C., Enjuanes, L. y Almazán, F.** (2005). A point mutation within the replicase gene differentially affects coronavirus genome versus minigenome replication. *J. Virol.* **79**: 15016-26.

**Garwes, D.J., Stewart, F. y Britton, P.** (1989). The polypeptide of Mr 14,000 of porcine transmissible gastroenteritis virus: gene assignment and intracellular location. *J. Gen. Virol.* **70**: 2495-9.

**Goebel, S.J., Hsue, B., Dombrowski, T.F. y Masters, P.S.** (2004). Characterization of the RNA components of a putative molecular switch in the 3' untranslated region of the murine coronavirus genome. *J. Virol.* **78**: 669-82.

**González, J.M., Gómez-Puertas, P., Cavanagh, D., Gorbalenya, A.E. y Enjuanes L.** (2003). A comparative sequence analysis to revise the current taxonomy of the family Coronaviridae. *Arch. Virol.* **148**: 2207-35.

**Gorbalenya, A.E., Snijder, E.J. y Spaan, W.J.** (2004). Severe acute respiratory syndrome coronavirus phylogeny: toward consensus. *J. Virol.* **78**: 7863-6.

**de Groot, R.J., van der Most, R.G. y Spaan, W.J.** (1992). The fitness of defective interfering murine coronavirus DI-a and its derivatives is decreased by nonsense and frameshift mutations. *J. Virol.* **66**: 5898-905.

**de Guzman, R.N., Wu, Z.R., Stalling, C.C., Pappalardo, L., Borer, P.N. y Summers, M.F.** (1998). Structure of the HIV-1 nucleocapsid protein bound to the SL3 psi-RNA recognition element. *Science.* **279**: 384-8.

**Haelterman, E.O. y Pensaert, M.B.** (1967). Pathogenesis of transmissible gastroenteritis of swine. pp. 569-572. *Proc. 18th Worl Vet. Congress, Paris.*

**Haijema, B.J., Volders, H. y Rottier, P.J.** (2003). Switching species tropism: an effective way to manipulate the feline coronavirus genome. *J. Virol.* **77**: 4528-38.

**Harrison, G.P., Miele, G., Hunter, E. y Lever, A.M.** (1998). Functional analysis of the core human immunodeficiency virus type 1 packaging signal in a permissive cell line. *J. Virol.* **72**: 5886-96.

**Hearing, P., Samulski, R.J., Wishart, W.L. y Shenk, T.** (1987). Identification of a repeated sequence element required for efficient encapsidation of the adenovirus type 5 chromosome. *J. Virol.* **61**: 2555-8.

**Herrewegh, A.A., Smeenk, I., Horzinek, M.C., Rottier, P.J. y de Groot, R.J.** (1998). Feline coronavirus type II strains 79-1683 and 79-1146 originate from a double recombination between feline coronavirus type I and canine coronavirus. *J. Virol.* **72**: 4508-14.

**Higgs, P.G.** RNA secondary structure: physical and computational aspects. (2000). *Q. Rev. Biophys.* **33**: 199-253.

**van der Hoek, L., Pyrc, K., Jebbink, M.F., Vermeulen-Oost, W., Berkhout, R.J., Wolthers, K.C., Wertheim-van Dillen, P.M., Kaandorp, J., Spaargaren, J. y Berkhout, B.** (2004). Identification of a new human coronavirus. *Nat. Med.* **10**: 368-73.

**Hofmann, M.A., Sethna, P.B. y Brian, D.A.** (1990). Bovine coronavirus mRNA replication continues throughout persistent infection in cell culture. *J. Virol.* **64**: 4108-14.

**Houzet, L., Paillart, J.C., Smagulova, F., Maurel, S., Morichaud, Z., Marquet, R. y Mougel, M.** (2007). HIV controls the selective packaging of genomic, spliced viral and cellular RNAs into virions through different mechanisms. *Nucleic. Acids. Res.* **35**: 2695-704.

**Hsue, B., Hartshorne, T. y Masters, P.S.** (2000). Characterization of an essential RNA secondary structure in the 3' untranslated region of the murine coronavirus genome. *J. Virol.* **74**: 6911-21.

**Hsue, B. y Masters, P.S.** (1997). A bulged stem-loop structure in the 3' untranslated region of the genome of the coronavirus mouse hepatitis virus is essential for replication. *J. Virol.* **71**: 7567-78.

**Huang, A.S. y Baltimore, D.** (1970). Defective viral particles and viral disease processes. *Nature.* **226**: 325-27.

**Huang, P. y Lai, M.M.C.** (1999). Polypyrimidine tract-binding protein binds to the complementary strand of the mouse hepatitis virus 3' untranslated region, thereby altering RNA conformation. *J. Virol.* **73**: 9110-6.

**Huang, P. y Lai, M.M.C.** (2001). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 binds to the 3'-untranslated region and mediates potential 5'-3'-end cross talks of mouse hepatitis virus RNA. *J. Virol.* **75**: 5009-17.

**Ito, N., Mossel, E.C., Narayanan, K., Popov, V.L., Huang, C., Inoue, T., Peters, C.J. y Makino, S.** (2005). Severe acute respiratory syndrome coronavirus 3a protein is a viral structural protein. *J. Virol.* **79**: 3182-6.

**Izeta, A., Smerdou, C., Alonso, S., Penzes, Z., Méndez, A., Plana-Durán, J. y Enjuanes, L.** (1999). Replication and packaging of transmissible gastroenteritis coronavirus-derived synthetic minigenomes. *J. Virol.* **73**: 1535-1545.

**Jacks, T., Power, M.D., Masiarz, F.R., Luciw, P.A., Barr, P.J. y Varmus, H.E.** (1988). Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature.* **331**: 280-3.

**Jiménez, G., Correa, I., Melgosa, M. P., Bullido, M. J. y Enjuanes, L.** (1986). Critical epitopes in transmissible gastroenteritis virus neutralization. *J. Virol.* **60**: 131-139.

**Junker-Niepmann, M., Bartenschlager, R. y Schaller, H.** (1990). A short cis-acting sequence is required for hepatitis B virus pregenome encapsidation and sufficient for packaging of foreign RNA. *EMBO J.* **9**: 3389-96.

**Kang, H, Feng, M., Schroeder, M.E., Giedroc, D.P. y Leibowitz, J.L.** (2006). Putative cis-acting stem-loops in the 5' untranslated region of the severe acute respiratory syndrome coronavirus can substitute for their mouse hepatitis virus counterparts. *J. Virol.* **80**: 10600-14.

**Keck, J.G., Matsushima, G.K., Makino, S., Fleming, J.O., Vannier, D.M., Stohlman, S.A. y Lai, M.M.** (1988). In vivo RNA-RNA recombination of coronavirus in mouse brain. *J. Virol.* **62**: 1810-3.

**Keck, J.G., Soe, L.H., Makino, S., Stohlman, S.A. y Lai, M.M.** (1988). RNA recombination of murine coronaviruses: recombination between fusion-positive mouse hepatitis virus A59 and fusion-negative mouse hepatitis virus 2. *J. Virol.* **62**: 1989-98.

**Keck, J.G., Stohlman, S.A., Soe, L.H., Makino, S. y Lai, M.M.** (1987). Multiple recombination sites at the 5'-end of murine coronavirus RNA. *Virology.* **156**: 331-41.

**Kim, Y., Jeong, Y. y Makino, S.** (1993). Analysis of *cis*-acting sequences essential for coronavirus defective interfering RNA replication. *Virology.* **197**: 53-63.

**Kim, Y.N. y Makino, S.** (1995). Characterization of a murine coronavirus defective interfering RNA internal cis-acting replication signal. *J. Virol.* **69**: 4963-71.

**Kim, K.H., Narayanan, K. y Makino, S.** (1998). Characterization of coronavirus DI RNA packaging. *Adv. Exp. Med. Biol.* **440**: 347-53.

**King, B. y Brian, D.A.** (1982). Bovine coronavirus structural proteins. *J. Virol.* **42**: 700-7.

**Kirkegaard, K. y Baltimore, D.** (1986). The mechanism of RNA recombination in poliovirus. *Cell.* **47**: 433-43.

**Khromykh, A. A., Varnavski, A. N., Sedlak, P. y Westaway, E. G.** (2001). Coupling between replication and packaging of flavivirus RNA: Evidence derived from the use of DNA-based full-length cDNA clones of Kunjin Virus. *J. Virol.* **75**: 4633-40.

**Kopecky-Bromberg, S.A., Martinez-Sobrido, L., Frieman, M., Baric, R.A. y Palese, P.** (2006). Severe acute respiratory syndrome coronavirus open reading frame (ORF) 3b, ORF 6, and nucleocapsid proteins function as interferon antagonists. *J. Virol.* **81**:548-57.

**Kottier, S.A., Cavanagh, D. y Britton, P.** (1995). Experimental evidence of recombination in coronavirus infectious bronchitis virus. *Virology.* **213**: 569-80.

**Ksiazek, T.G., Erdman, D., Goldsmith, C.S., Zaki, S.R., Peret, T., Emery, S., Tong, S., Urbani, C., Comer, J.A., Lim, W., Rollin, P.E., Dowell, S.F., Ling, A.E., Humphrey, C.D., Shieh, W.J., Guarner, J., Paddock, C.D., Rota, P., Fields, B., DeRisi, J., Yang, J.Y., Cox, N., Hughes, J.M., LeDuc, J.W., Bellini, W.J. y Anderson, L.J.** (2003). A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.* **348**: 1953-66.

**Kusters, J.G., Jager, E.J., Niesters, H.G. y van der Zeijst, B.A.** (1990). Sequence evidence for RNA recombination in field isolates of avian coronavirus infectious bronchitis virus. *Vaccine.* **8**: 605-8.

## ***bibliografía***

**Lai, M. M. C.** (1990). Coronavirus: organization, replication and expression of genome. *Annu. Rev. Microbiol.* **44**: 303-333.

**Lai, M.M.** (1992). RNA recombination in animal and plant viruses. *Microbiol. Rev.* **56**: 61-79.

**Lai, M.M.C.** (1998). Cellular factors in the transcription and replication of viral RNA genomes: a parallel to DNA-dependent RNA transcription. *Virology.* **244**: 1-12.

**Lai, M.M.C. y Cavanagh, D.** (1997). The molecular biology of coronaviruses. *Adv. Virus Res.* **48**: 1-100.

**Laude, H., Chapsal, J.M., Gelfi, J., Labiau, S. y Grosclaude, J.** (1986). Antigenic structure of transmissible gastroenteritis virus. I. Properties of monoclonal antibodies directed against virion proteins. *J. Gen. Virol.* **67**: 119-30.

**Lever, A., Gottlinger, H., Haseltine, W. y Sodroski, J.** (1989). Identification of a sequence required for efficient packaging of human immunodeficiency virus type 1 RNA into virions. *J. Virol.* **63**: 4085-7.

**Levin, J.G. y Seidman, J.G.** (1979). Selective packaging of host tRNA's by murine leukemia virus particles does not require genomic RNA. *J. Virol.* **29**: 328-35.

**Levis. R., Weiss, B.G., Tsiang, M., Huang, H. y Schlesinger, S.** (1986). Deletion mapping of Sindbis virus DI RNAs derived from cDNAs defines the sequences essential for replication and packaging. *Cell.* **44**:137-45.

**Li, H.P., Huang, P., Park, S., Lai, M.M.C.** (1999). Polypyrimidine tract-binding protein binds to the leader RNA of mouse hepatitis virus and serves as a regulator of viral transcription. *J. Virol.* **73**: 772-7.

**Li, H.P., Zhang, X., Duncan, R., Comai, L. y Lai, M.M.C.** (1997). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 binds to the transcription-regulatory region of mouse hepatitis virus RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**: 9544-9.

**Liao, C.L. y Lai, M.M.** (1995). A cis-acting viral protein is not required for the replication of a coronavirus defective-interfering RNA. *Virology*. **209**: 428-36.

**Lim, K.P. y Liu, D.X.** (2001). The missing link in coronavirus assembly. Retention of the avian coronavirus infectious bronchitis virus envelope protein in the pre-Golgi compartments and physical interaction between the envelope and membrane proteins. *J. Biol. Chem.* **276**: 17515-23.

**Lin, Y.J. y Lai, M.M.C.** (1993). Deletion mapping of a mouse hepatitis virus defective interfering RNA reveals the requirement of an internal and discontinuous sequence for replication. *J. Virol.* **67**: 6110-8.

**Lin, Y.J., Liao, C.L. y Lai, M.M.C.** (1994). Identification of the cis-acting signal for minus-strand RNA synthesis of a murine coronavirus: implications for the role of minus-strand RNA in RNA replication and transcription. *J. Virol.* **68**: 8131-40.

**Lin, Y.-J., Zhang, X., Wu, R.-C. y Lai, M.M.C.** (1996). The 3' untranslated region of coronavirus RNA is required for subgenomic mRNA transcription from a defective interfering RNA. *J. Virol.* **70**: 7236-40.

**Lomniczi, B. y Morser, J.** (1981). Polypeptides of infectious bronchitis virus. I. Polypeptides of the virion. *J. Gen. Virol.* **55**: 155-64.

**Lu, W., Zheng, B.J., Xu, K., Schwarz, W., Du, L., Wong, C.K., Chen, J., Duan, S., Deubel, V. y Sun, B.** (2006). Severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus 3a protein forms an ion channel and modulates virus release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**: 12540-5.

## ***bibliografía***

**Luban, J. y Goff, S.P.** (1994). Mutational analysis of cis-acting packaging signals in human immunodeficiency virus type 1 RNA. *J. Virol.* **68**: 3784-93.

**Luytjes, W., Gerritsma, H. y Spaan, W.J.** (1996). Replication of synthetic defective interfering RNAs derived from coronavirus mouse hepatitis virus-A59. *Virology.* **216**: 174-83.

**Makino, S., Fujioka, N. y Fujiwara, K.** (1985). Structure of the intracellular defective viral RNAs of defective interfering particles of mouse hepatitis virus. *J. Virol.* **54**: 329-36.

**Makino, S., Shieh, C.K., Soe, L.H., Baker, S.C. y Lai, M.M.** (1988). Primary structure and translation of a defective interfering RNA of murine coronavirus. *Virology.* **166**: 550-60.

**Makino, S., Taguchi, F., Hirano, N. y Fujiwara, K.** (1984). Analysis of genomic and intracellular viral RNAs of small plaque mutants of mouse hepatitis virus, JHM strain. *Virology.* **139**: 138-51.

**Makino, S., Yokomori, K. y Lai, M.M.** (1990). Analysis of efficiently packaged defective interfering RNAs of murine coronavirus: localization of a possible RNA-packaging signal. *J. Virol.* **64**: 6045-53.

**van Marle, G., Luytjes, W., van der Most, R.G., van der Straaten, T. y Spaan, W.J.** (1995). Regulation of coronavirus mRNA transcription. *J. Virol.* **69**: 7851-6.

**van Marle, G., Dobbe, J.C., Gultyaev, A.P., Luytjes, W., Spaan, W.J.M. y Snijder, E.J.** (1999). Arterivirus discontinuous mRNA transcription is guided by base pairing between sense and antisense transcription-regulating sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**: 12056-61.

**Masters, P.S.** (2006). The molecular biology of coronaviruses. *Adv. Virus Res.* **66**: 193-292.



**McBride, M.S. y Panganiban, A.T.** (1996). The human immunodeficiency virus type 1 encapsidation site is a multipartite RNA element composed of functional hairpin structures. *J. Virol.* **70** (5): 2963-73. *Erratum* en: (1997). *J. Virol.* **71**: 858.

**McBride, M.S. y Panganiban, A.T.** (1997). Position dependence of functional hairpins important for human immunodeficiency virus type 1 RNA encapsidation in vivo. *J. Virol.* **71**: 2050-8.

**McBride, M.S., Schwartz, M.D. y Panganiban, A.T.** (1997). Efficient encapsidation of human immunodeficiency virus type 1 vectors and further characterization of cis elements required for encapsidation. *J. Virol.* **71**: 4544-54.

**McClurkin, A. W. y Norman, J. O.** (1966). Studies on transmissible gastroenteritis of swine. II. Selected characteristics of a cytopathogenic virus common to five isolates from transmissible gastroenteritis. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.* **30**: 190-8.

**Méndez, A., Smerdou, C., Gebauer, F., Izeta, A. y Enjuanes, L.** (1996). Molecular characterization of transmissible gastroenteritis coronavirus defective interfering genomes: packaging and heterogeneity. *Virology.* **217**: 495-507.

**McGoldrick, A., Lowings, J.P. y Paton, D.J.** (1999). Characterisation of a recent virulent transmissible gastroenteritis virus from Britain with a deleted ORF 3a. *Arch. Virol.* **144**: 763-70.

**Miller, W.L., Martial, J.A. y Baxter, J.D.** (1980). Molecular cloning of DNA complementary to bovine growth hormone mRNA. *J. Biol. Chem.* **255**: 7521-4.

**Molenkamp, R., Greve, S., Spaan, W.J. y Snijder, E.J.** (2000). Efficient homologous RNA recombination and requirement for an open reading frame during replication of equine arteritis virus defective interfering RNAs. *J. Virol.* **74**: 9062-70.

## ***bibliografía***

**Molenkamp, R. y Spaan, W.J.** (1997). Identification of a specific interaction between the coronavirus mouse hepatitis virus A59 nucleocapsid protein and packaging signal. *Virology*. **239**: 78-86.

**Moreno, J.L, Zúñiga, S., Enjuanes, L. y Sola, I.** (2007). Identification of an enhacer in Coronavirus. *J. Virol. Enviado*.

**van der Most, R.G., Bredenbeek, P.J. y Spaan, W.J.** (1991). A domain at the 3' end of the polymerase gene is essential for encapsidation of coronavirus defective interfering RNAs. *J. Virol.* **65**: 3219-26.

**van der Most, R.G., Luytjes, W., Rutjes, S. y Spaan, W.J.** (1995). Translation but not the encoded sequence is essential for the efficient propagation of the defective interfering RNAs of the coronavirus mouse hepatitis virus. *J. Virol.* **69**: 3744-51.

**Muriaux ,D., Mirro, J., Harvin, D. y Rein, A.** (2001). RNA is a structural element in retrovirus particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 5246-51.

**Muriaux, D., Mirro, J., Nagashima, K., Harvin, D. y Rein, A.** (2002). Murine leukemia virus nucleocapsid mutant particles lacking viral RNA encapsidate ribosomes. *J. Virol.* **76**: 11405-13.

**Narayanan, K., Chen, C.J., Maeda, J. y Makino, S.** (2003). Nucleocapsid-independent specific viral RNA packaging via viral envelope protein and viral RNA signal. *J. Virol.* **77**: 2922-7.

**Narayanan, K., Maeda, A., Maeda, J. y Makino, S.** (2000). Characterization of the coronavirus M protein and nucleocapsid interaction in infected cells. *J. Virol.* **74**: 8127-34.

**Narayanan, K. y Makino, S.** (2001). Cooperation of an RNA packaging signal and a viral envelope protein in coronavirus RNA packaging. *J. Virol.* **75**: 9059-67.

**Nash, T.C. y Buchmeier, M.J.** (1997). Entry of mouse hepatitis virus into cells by endosomal and nonendosomal pathways. *Virology* **223**: 68-78.

**Nelson, G.W. y Stohlman, S.A.** (1993). Localization of the RNA-binding domain of mouse hepatitis virus nucleocapsid protein. *J. Gen. Virol.* **74**: 1975-9.

**Nelson, G.W., Stohlman, S.A. y Tahara, S.M.** (2000). High affinity interaction between nucleocapsid protein and leader/intergenic sequence of mouse hepatitis virus RNA. *J. Gen. Virol.* **81**: 181-8.

**Nugent, C. I., Johnson, K. L., Sarnow, P. y Kirkegaard, K.** (1999). Functional coupling between replication and packaging of poliovirus replicon RNA. *J. Virol.* **73**: 427-35.

**Onafuwa-Nuga, A.A., King, S.R., y Telesnitsky, A.** (2005). Nonrandom packaging of host RNAs in moloney murine leukemia virus. *J. Virol.* **79**: 13528-37.

**Ortego, J., Escors, D., Laude, H. y Enjuanes, L.** (2002). Generation of a replication-competent, propagation-deficient virus vector based on the transmissible gastroenteritis coronavirus genome. *J. Virol.* **76**: 11518-29.

**Ortego, J., Sola, I., Almazán, F., Ceriani, J. E., Riquelme, C., Balasch, M., Planadurán, J. y Enjuanes, L.** (2003). Transmissible gastroenteritis coronavirus gene 7 is not essential but influences in vivo virus replication and virulence. *Virology*. **308**: 13-22.

**Osborne, J.C. y Elliott, R.M.** (2000). RNA binding properties of bunyamwera virus nucleocapsid protein and selective binding to an element in the 5' terminus of the negative-sense S segment. *J. Virol.* **74**: 9946-52.

**Paillart, J.-C., Skripkin, E., Ehresmann, B., Ehresmann, C. y Marquet, R.** (1996). A loop-loop “kissing” complex is the essential part of the dimer linkage of genomic HIV-1 RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**: 5572–7.

**Parker, M.M. y Masters, P.S.** (1990). Sequence comparison of the N genes of five strains of the coronavirus mouse hepatitis virus suggests a three domain structure for the nucleocapsid protein. *Virology*. **179**: 463-8.

**Pasternak, A.O., van den Born, E., Spaan, W.J.M y Snijder, E.J.** (2001). Sequence requirements for RNA strand transfer during nidovirus discontinuous subgenomic RNA synthesis. *EMBO J.* **20**: 7220-8.

**Peiris, J.S., Lai, S.T., Poon, L.L., Guan, Y., Yam, L.Y., Lim, W., Nicholls, J., Yee, W.K., Yan, W.W., Cheung, M.T., Cheng, V.C., Chan, K.H., Tsang, D.N., Yung, R.W., Ng, T.K. y Yuen, K.Y.** (2003) Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet*. **361**: 1319-25.

**Penzes, Z., González, J. M., Calvo, E., Izeta, A., Smerdou, C., Méndez, A., Sánchez, C. M., Sola, I., Almazán, F. y Enjuanes, L.** (2001). Complete genome sequence of transmissible gastroenteritis coronavirus PUR46-MAD clone and evolution of the purdue virus cluster. *Virus Genes*. **23**: 105-18.

**Penzes, Z., Tibbles, K., Shaw, K., Britton, P., Brown, T.D. y Cavanagh, D.** (1994). Characterization of a replicating and packaged defective RNA of avian coronavirus infectious bronchitis virus. *Virology*. **203**: 286-93.

**Penzes, Z., Wroe, C., Brown, T.D., Britton, P. y Cavanagh, D.** (1996). Replication and packaging of coronavirus infectious bronchitis virus defective RNAs lacking a long open reading frame. *J. Virol.* **70**: 8660-8.

**Peters, G.G. y Hu, J.** (1980). Reverse transcriptase as the major determinant for selective packaging of tRNA's into Avian sarcoma virus particles. *J. Virol.* **36**: 692-700.

**Pringle, C. R.** (1998). The universal system of virus taxonomy of the International Committee on Virus Taxonomy (ICTV), including new proposals ratified since publication of the Sixth ICTV report in 1995. *Arch. Virol.* **143**: 203-210.

**Qu, F. y Morris, T.J.** (1997). Encapsidation of turnip crinkle virus is defined by a specific packaging signal and RNA size. *J. Virol.* **71**: 1428-35.

**Raman, S., Bouma, P., Williams, G.D. y Brian, D.A.** (2003). Stem-loop III in the 5' untranslated region is a cis-acting element in bovine coronavirus defective interfering RNA replication. *J. Virol.* **77**: 6720-30.

**Raman, S. y Brian, D.A.** (2005). Stem-loop IV in the 5' untranslated region is a cis-acting element in bovine coronavirus defective interfering RNA replication. *J. Virol.* **79**: 12434-46.

**Risco, C., Antón, I. M., Enjuanes, L. y Carrascosa, J. L.** (1996). The transmissible gastroenteritis coronavirus contains a spherical core shell consisting of M and N proteins. *J. Virol.* **70**: 4773-4777.

**Roseto, A., Bobulesco, P., Laporte, J., Escaig, J., Gaches, D. y Peries, J.** (1982). Bovine enteric coronavirus structure as studied by a freeze-drying technique. *J. Gen. Virol.* **63**: 241-5.

**Rulli, S.J. Jr., Hibbert, C.S., Mirro, J., Pederson, T., Visual, S. y Rein, A.** (2007). Selective and nonselective packaging of cellular RNAs in retrovirus particles. *J. Virol.* **81**: 6623-31.

**Rumenapf, T., Brown, D.T., Strauss, E.G., Konig, M., Rameriz-Mitchel, R. y Strauss, J.H.** (1995). Aura alphavirus subgenomic RNA is packaged into virions of two sizes. *J. Virol.* **69**: 1741-6.

**Saif, L.J. y Wesley, R.D.** (1992). Transmissible gastroenteritis, *En* "Diseases of swine" (A.D. Leman, B.E. Straw, W.L. Mengeling, S. D'Allaire y D.J. Taylor, eds.), pp. 362-386. Wolfe Publishing Ltd, Ames. Iowa.

**Sambrook, J. y Russell, R.** (2001). "Molecular cloning: a laboratory manual". Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

**Sánchez, C.M., Izeta, A., Sánchez-Morgado, J.M., Alonso, S., Sola, I., Balasch, M., Plana-Durán, J. y Enjuanes, L.** (1999). Targeted recombination demonstrates that the spike gene of transmissible gastroenteritis coronavirus is a determinant of its enteric tropism and virulence. *J. Virol.* **73**: 7607-18.

**Sasavage, N.L., Smith, M., Gillam, S., Astell, C., Nilson, J.H. y Rottman, F.** (1980). Use of oligodeoxynucleotide primers to determine poly(adenylic acid) adjacent sequences in messenger ribonucleic acid. 3'-Terminal noncoding sequence of bovine growth hormone messenger ribonucleic acid. *Biochemistry.* **19**: 1737-43.

**Sawicki, S. G. y Sawicki, D. L.** (1998). A new model for coronavirus transcription. *Adv. Exp. Med. Biol.* **440**: 215-220.

**Schelle, B., Karl, N., Ludewig, B., Siddell, S.G. y Thiel, V.** (2005). Selective replication of coronavirus genomes that express nucleocapsid protein. *J. Virol.* **79**: 6620-30.

**Sethna, P.B., Hofmann, M.A. y Brian, D.A.** (1991). Minus-strand copies of replicating coronavirus mRNAs contain antileaders. *J. Virol.* **65**: 320-5.

**Sethna, P.B., Hung, S.L. y Brian, D.A.** (1989). Coronavirus subgenomic minus-strand RNAs and the potential for mRNA replicons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**: 5626-30.

**Severson, W.E., Xu, X. y Jonson, C.B.** (2001). cis-Acting signals in encapsidation of Hantaan virus S-segment viral genomic RNA by its N protein. *J. Virol.* **75**: 2646-52.

**Sgro, J. Y., Holt, J., Zuker, M. y Palmenberg, A.** (2004). RNA folding of the complete SARS and MHV coronavirus genomes. *Seventh International Symposium on Positive Strand RNA Viruses. San Francisco, California, USA.*

**Shi, S.T., Huang, P., Li, H.P. y Lai, M.M.C.** (2000). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 regulates RNA synthesis of a cytoplasmic virus. *EMBO J.* **19**: 4701-11.

**Snijder, E.J., Bredenbeek, P.J., Dobbe, J.C., Thiel, V., Ziebuhr, J., Poon, L.L., Guan, Y., Rozanov, M., Spaan, W.J. y Gorbalenya AE. (2003).** Unique and conserved features of genome and proteome of SARS-coronavirus, an early split-off from the coronavirus group 2 lineage. *J. Mol. Biol.* **331**: 991-1004.

**Snijder, E.J. y Horzinek, M.C. (1993).** Toroviruses: replication, evolution and comparison with other members of the coronavirus-like superfamily. *J. Gen. Virol.* **74**: 2305-16.

**Snijder, E.J., van der Meer, Y., Zevenhoven-Dobbe, J., Onderwater, J.J., van der Meulen, J., Koerten, H.K. y Mommaas, A.M. (2006).** Ultrastructure and origin of membrane vesicles associated with the severe acute respiratory syndrome coronavirus replication complex. *J. Virol.* **80**:5927-40.

**Snijder, E.J. y Meulenberg, J.J. (1998).** The molecular biology of arteriviruses. *J. Gen. Virol.* **79**: 961-79.

**Sola, I., Moreno, J.L., Zúniga, S., Alonso, S. y Enjuanes, L. (2005).** Role of nucleotides immediately flanking the transcription-regulating sequence core in coronavirus subgenomic mRNA synthesis. *J. Virol.* **79**: 2506-16.

**Spaan, W. J. M., Cavanagh, D., de Groot, R. J., Enjuanes, L., Gorbalenya, A. E., Snijder, E. J., y Walker, P. J. (2005).** *Nidovirales*. En "Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses" (C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, y L. A. Ball, Eds.), pp. 937-945. Academic Press, San Diego, California.

**Spaan, W. H., Delius, H., Skinner, M., Armstrong, J., Rottier, P., Smeekens, S., van der Zeijst, B. A. M. y Siddell, S. G. (1983).** Coronavirus mRNA synthesis involves fusion of non-contiguous sequences. *EMBO J.* **2**: 1839-44.

## ***bibliografía***

**St-Jean, J.R., Desforjes, M., Almazán, F., Jacomy, H., Enjuanes, L. y Talbot, P.J.** (2006). Recovery of a neurovirulent human coronavirus OC43 from an infectious cDNA clone. *J Virol.* **80**:3670-4.

**Stohlman, S.A., Baric, R.S., Nelson, G.N., Soe, L.H., Welter, L.M. y Deans, R.J.** (1988). Specific interaction between coronavirus leader RNA and nucleocapsid protein. *J. Virol.* **62**: 4288-95.

**Stohlman, S.A. y Lai, M.M.** (1979). Phosphoproteins of murine hepatitis viruses. *J. Virol.* **32**: 672-5.

**Sturman, L. S., Holmes, K. V. y Behnke, J.** (1980). Isolation of coronavirus envelope glycoproteins and interaction with the viral nucleocapsid. *J. Virol.* **33**: 449-62.

**Tahara, S.M., Dietlin, T.A., Bergmann, C.C., Nelson, G.W., Kyuwa, S., Anthony, R.P. y Stohlman, S.A.** (1994). Coronavirus translational regulation: leader affects mRNA efficiency. *Virology.* **202**: 621-30.

**Tchatalbachev, S., Flick, R. y Hobom, G.** (2001). The packaging signal of influenza viral RNA molecules. *RNA.* **7**: 979-89.

**Thiel, V., Herold, J., Schelle, B. y Siddell, S.G.** (2001). Viral replicase gene products suffice for coronavirus discontinuous transcription. *J. Virol.* **75**: 6676-81.

**Tresnan, D.B., Levis, R. y Holmes, K.V.** (1996). Feline aminopeptidase N serves as a receptor for feline, canine, porcine, and human coronaviruses in serogroup I. *J. Virol.* **70**: 8669-74.

**Vabret, A., Dina, J., Gouarin, S., Petitjean, J., Corbet, S., y Freymuth, F.** (2006). Detection of the new human coronavirus HKU1: a report of 6 cases. *Clin. Infect. Dis.* **42**: 634-9.



**Volkova, E., Gorchakov, R. y Frolov, I.** (2006). The efficient packaging of Venezuelan equine encephalitis virus-specific RNAs into viral particles is determined by nsP1-3 synthesis. *Virology*. **344**: 315-27.

**Wang, L., Junker, D. y Collisson, E.W.** (1993). Evidence of natural recombination within the S1 gene of infectious bronchitis virus. *Virology*. **192**: 710-6.

**Wang, M.L., Huang, L., Bongard-Pierce, D.K., Belmonte, S., Zachgo, E.A., Morris, J.W., Dolan, M. y Goodman, H.M.** (1997). Construction of an approximately 2 Mb contig in the region around 80 cM of *Arabidopsis thaliana* chromosome 2. *Plant. J.* **12**: 711-30.

**Wang, Y. y Zhang, X.** (1999). The nucleocapsid protein of coronavirus mouse hepatitis virus interacts with the cellular heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 in vitro and in vivo. *Virology*. **265**: 96-109.

**Williams, G.D., Chang, R.Y. y Brian, D.A.** (1999). A phylogenetically conserved hairpin-type 3' untranslated region pseudoknot functions in coronavirus RNA replication. *J. Virol.* **73**: 8349-55.

**Wilson, L., C., Gage, P. y Ewart, G.** (2006). Hexamethylene amiloride blocks E protein ion channels and inhibits coronavirus replication. *Virology*. **353**: 294-306.

**Wilson, L., McKinlay, C., Gage, P. y Ewart, G.** (2004). SARS coronavirus E protein forms cation-selective ion channels. *Virology*. **330**: 322-31.

**Woo, K., Joo, M., Narayanan, K., Kim, K.H. y Makino, S.** (1997). Murine coronavirus packaging signal confers packaging to nonviral RNA. *J. Virol.* **71**: 824-7.

**Woo, P.C., Lau, S.K., Li, K.S., Poon, R.W., Wong, B.H., Tosí, H.W., Yip, B.C., Huang, Y., Chan, K.H. y Yuen, K.Y.** (2006). Molecular diversity of coronaviruses in bats. *Virology*. **351**: 180-7.

**Woychik, R.P., Camper, S.A., Lyons, R.H., Horowitz, S., Goodwin, E.C. y Rottman, F.M.** (1982). Cloning and nucleotide sequencing of the bovine growth hormone gene. *Nucleic. Acids. Res.* **10**: 7197-210.

**Wu, X., Conway, J.A., Kim, J. y Capees, J.C.** (1994). Localization of the Vpx packaging signal within the C terminus of the human immunodeficiency virus type 2 Gag precursor protein. *J. Virol.* **68**: 6161-9.

**Yang, J., Hooper, D.C., Wunner, W.H., Koprowski, H., Dietzschold, B. y Fu, Z.F.** (1988). The specificity of rabies virus RNA encapsidation by nucleoprotein. *Virology.* **242**: 107-17.

**Yeager, C.L., Ashmun, R.A., Williams, R.K., Cardellichio, C.B., Shapiro, L.H., Look, A.T. y Holmes, K.V.** (1992). Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. *Nature.* **357**: 420-2.

**Yount, B., Denison, M.R., Weiss, S.R. y Baric, R.S.** (2002). Systematic assembly of a full-length infectious cDNA of mouse hepatitis virus strain A59. *J. Virol.* **76**: 11065-78.

**Zakhartchouk, A.N., Viswanathan, S., Mahony, J.B., Gauldie, J. y Babiuk, L.A.** (2005). Severe acute respiratory syndrome coronavirus nucleocapsid protein expressed by an adenovirus vector is phosphorylated and immunogenic in mice. *J. Gen. Virol.* **86**: 211-5.

**Zeffman, A., Hassard, S., Varani, G. y Lever, A.** (2000). The major HIV-1 packaging signal is an extended bulged stem loop whose structure is altered on interaction with the Gag polyprotein. *J. Mol. Biol.* **297** (4): 877-93. *Erratum* en: (2000). *J. Mol. Biol.* **301**: 1315.

**Zhang, X. y Lai, M.M.C.** (1995). Interactions between the cytoplasmic proteins and the intergenic (promoter) sequence of mouse hepatitis virus RNA: correlation with the amounts of subgenomic mRNA transcribed. *J. Virol.* **69**: 1637-44.

**Zhao, X., Shaw, K. y Cavanagh, D.** (1993). Presence of subgenomic mRNAs in virions of coronavirus IBV. *Virology*. **196**: 172-8.

**Zhou, M. y Collisson, E.W.** (2000). The amino and carboxyl domains of the infectious bronchitis virus nucleocapsid protein interact with 3' genomic RNA. *Virus. Res.* **67**: 31-9.

**Ziebuhr, J. y Snijder, E.J.** (2007). The coronavirus replicase: Special enzymes for special viruses. En: "Molecular and Cellular Biology: Coronaviruses". (V. Thiel, Ed.), pp. 31-61. Norfolk, UK.

**Zuker, M.** (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic. Acids. Res.* **31**: 3406-15.

**Zúñiga, S., Sola, I., Alonso, S. y Enjuanes L.** (2004). Sequence motifs involved in the regulation of discontinuous coronavirus subgenomic RNA synthesis. *J. Virol.* **78**: 980-94.

**Zúñiga, S., Sola, I., Moreno, J.L., Sabella, P., Plana-Durán, J. y Enjuanes, L.** (2006). Coronavirus nucleocapsid protein is an RNA chaperone. *Virology*. **357**: 215-227.

